

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA

LUIZA OLIVEIRA PERUCCI

**PRÉ-ECLÂMPsia: AVALIAÇÃO DE ENDOGLINA SOLÚVEL, FATOR  
DE CRESCIMENTO TRANSFORMANTE BETA-1 E RECEPTORES  
SOLÚVEIS DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA**

Belo Horizonte  
2013

LUIZA OLIVEIRA PERUCCI

**PRÉ-ECLÂMPسيا: AVALIAÇÃO DE ENDOGLINA SOLÚVEL, FATOR  
DE CRESCIMENTO TRANSFORMANTE BETA-1 E RECEPTORES  
SOLÚVEIS DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lirlândia Pires de Sousa.

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luci Maria Sant'Ana Dusse.

Belo Horizonte  
2013

P471p Perucci, Luiza Oliveira.  
Pré-eclâmpsia: avaliação de endoglina solúvel, fator de crescimento transformante beta-1 e receptores solúveis do fator de necrose tumoral alfa / Luiza Oliveira Perucci. – 2013.  
113 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Lirlândia Pires de Sousa.  
Co-orientadora: Profa. Dra. Luci Maria Sant'Ana Dusse.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Pré-eclâmpsia – Teses. 2. Endoglina solúvel – Teses. 3. Diagnóstico de laboratório – Teses. 4. Gravidez – Complicações. – Teses. I. Sousa, Lirlândia Pires. II. Dusse, Luci Maria Sant'Ana. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD 616.15

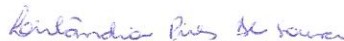
## FOLHA DE APROVAÇÃO

**LUIZA OLIVEIRA PERUCCI**

**“Pré-eclampsia: avaliação de endoglina solúvel, fator de crescimento transformante beta 1 e receptores solúveis do fator de necrose tumoral alfa”**

Dissertação, como requisito parcial para obter o título de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovada em vinte e quatro de junho de 2013.

### COMISSÃO EXAMINADORA



Profa. Dra. Lirlândia Pires de Sousa - UFMG



Profa. Dra. Luci Maria Sant'Ana Dusse - UFMG



Prof. Dr. Augusto Henriques F. Brandão - UFMG



Prof. Dr. Antônio Lúcio Teixeira Júnior - UFMG



Profa. Dra. Danyelle Romana Alves Rios - UFSJ

Dedico este trabalho a minha família e às participantes deste estudo.

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lirlândia Pires de Sousa, pela orientação, confiança e exemplo de competência e comprometimento com os seus alunos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luci Maria Sant'Ana Dusse, pela orientação, ensinamentos e por sempre me estimular ao crescimento acadêmico.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karina Braga Gomes Borges, pela disponibilidade, paciência e enorme contribuição na execução desse trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Sales Moura Fernandes, pela disponibilidade do laboratório de Biologia Molecular.

Aos funcionários dos hospitais e maternidades que participaram deste estudo.

Às pacientes com pré-eclâmpsia, às gestantes normotensas e às mulheres não gestantes pelo altruísmo e pela confiança depositada. Obrigada por contribuírem para o meu amadurecimento pessoal.

Ao Prof. Dr. Antônio Lúcio Teixeira pela colaboração nos experimentos.

À Aline Silva de Miranda pelo auxílio nos experimentos.

Aos coordenadores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFMG, Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior e Prof. Dr. Márcio de Matos Coelho, e aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação Eduardo e Silas, que sempre estiveram disponíveis para me auxiliar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por viabilizar a minha dedicação ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

À Letícia Gonçalves pelo auxílio e dicas preciosas durante as coletas de amostras.

À Lara Godoi, Melina Pinheiro e Patrícia Alpoim por proporcionarem as amostras indispensáveis à realização deste trabalho e pela disponibilidade em me ajudar sempre que precisei.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Daniele da Glória de Souza e ao Caio Fagundes por me acolherem durante os meus primeiros passos na pesquisa, pelos ensinamentos e inspiração.

Aos alunos do 7º período do curso noturno de Farmácia, com os quais realizei o Estágio em Docência, pela paciência e compreensão.

Aos técnicos, alunos e professores dos laboratórios do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG e do laboratório de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, por toda a ajuda na condução deste trabalho.

Aos colegas Aline Fortunato, Bruno Rocha, Camila Chaves, Juliana Vago, Kátia Maciel, Luciana Tavares, Mayara Faria, Nathalia Pietrani, Raquel Cordeiro e Thaís de Caux pela amizade, ajuda e momentos de descontração.

A minha mãe e a minha irmã Flavinha pelo apoio e carinho incondicionais. Vocês são as razões da minha vida!

Ao meu pai pelo exemplo de dedicação, honestidade e resignação. Mesmo ausente, posso sentir que me apoia e torce pela minha felicidade.

Ao meu namorado Heron pelo amor, companheirismo e por sempre me tranquilizar e mostrar que eu sou capaz de realizar os meus sonhos.

Aos familiares e amigos pela torcida e por compartilharem mais essa etapa da minha vida.

À Deus por me conceder saúde e força para transpor os obstáculos.

A todas as pessoas que, através de pequenos gestos, tornaram possível a realização deste trabalho.



## RESUMO

A pré-eclâmpsia (PE) é caracterizada pelo aparecimento de hipertensão e proteinúria em gestantes normotensas, após a vigésima semana de gestação. Clinicamente, é importante diagnosticar a forma grave da PE, na qual o acometimento sistêmico é maior. A doença pode ainda ser classificada de acordo a idade gestacional na qual surgem os sintomas, sendo PE precoce quando surge antes da 34<sup>a</sup> semana, ou PE tardia, de surgimento maior ou igual a 34<sup>a</sup> semana de gestação. Estudos sugerem que um desequilíbrio de fatores angiogênicos, tais como a endogлина solúvel (sEng) e o fator de crescimento transformante beta-1 (TGF-β1), bem como um estado inflamatório exacerbado, evidenciado pela liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), contribuem para a disfunção endotelial e as manifestações clínicas da doença. O principal objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre os níveis plasmáticos de sEng, TGF-β1 e dos receptores solúveis do TNF-α (sTNF-R1 e sTNF-R2) e a ocorrência de PE, classificada segundo a gravidade e idade gestacional de surgimento dos sintomas. Foram avaliadas 87 mulheres: 23 não gestantes, 21 gestantes normotensas e 43 gestantes com PE. As gestantes com PE foram estratificadas em subgrupos de acordo com a gravidade [PE leve (n=12) e PE grave (n=31)] e com a idade gestacional na qual surgiram os sintomas da doença [PE precoce (n=19) e PE tardia (n=24)]. Os níveis plasmáticos de sEng, TGF-β1, sTNF-R1 e sTNF-R2 foram determinados por ELISA. Os resultados evidenciaram que os níveis de sEng e de sTNF-R1 foram maiores nas gestantes com PE em comparação às gestantes normotensas (sEng:  $p < 0,001$ , sTNF-R1:  $p = 0,014$ ) e às mulheres não gestantes ( $p < 0,001$  em ambos os casos), e nas gestantes normotensas em relação às mulheres não gestantes ( $p < 0,001$  em ambos os casos). Os níveis de sTNF-R2 foram maiores nas gestantes com PE em comparação às mulheres não gestantes ( $p < 0,001$ ), mas não mostrou diferença quando comparado às gestantes normotensas. O mesmo parâmetro mostrou-se aumentado nas gestantes normotensas em comparação às mulheres não gestantes ( $p < 0,001$ ). Nenhuma diferença foi observada nos níveis de TGF-β1 entre os três grupos avaliados. As gestantes com PE tardia apresentaram maiores níveis de sTNF-R1 ( $p = 0,004$ ) e sTNF-R2 ( $p = 0,003$ ) quando comparado às gestantes com PE precoce e nenhuma diferença foi observada nos níveis de sEng e TGF-β1. Os níveis de sEng foram maiores nas gestantes com PE grave em comparação às gestantes

com PE leve ( $p=0,005$ ) e nenhuma diferença foi observada nos níveis de TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1 e sTNF-R2. A análise de regressão logística revelou que a primiparidade e os níveis plasmáticos de sEng estão associados independentemente ao desenvolvimento da PE. Além disso, os níveis de sEng estão associados independentemente à gravidade da doença. Nenhuma variável analisada foi associada independentemente à idade gestacional na qual surgiram os sintomas da PE. Esses resultados sugerem que a sEng, o sTNF-R1 e o sTNF-R2 estão associados com a gestação, sendo que a sEng e o sTNF-R1 estão mais elevados em gestantes com PE. Além disso, os dados obtidos sugerem que níveis elevados de ambos os receptores de TNF- $\alpha$  estão associados com a PE tardia, enquanto maiores níveis de sEng estão presentes em gestantes que apresentam a forma grave da doença.

**Palavras-chave:** Pré-eclâmpsia; sEng; TGF- $\beta$ 1; sTNF-R1; sTNF-R2.

## ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is characterized by the onset of hypertension and proteinuria in normotensive pregnant women after the twentieth week of gestation. Clinically, it is important to diagnose the severe form of PE, in which the systemic involvement is higher. According to the gestational age at PE onset, this disease can also be classified in early PE or late PE (<34 or ≥34 weeks of gestation). Studies suggest that an imbalance between angiogenic factors, such as soluble endoglin (sEng) and transforming growth factor beta-1 (TGF-β1), as well as an exacerbated inflammatory state, contribute to the endothelial dysfunction and the clinical manifestations of the disease. The main objective of this study was to evaluate the association between plasma levels of sEng, TGF-β1 and TNF-α soluble receptors (sTNF-R1 and sTNF-R2) and the occurrence of PE, classified according to the severity and onset-time of the disease. We evaluated 87 women: 23 non pregnant, 21 normotensive pregnant and 43 preeclamptic. Pregnant women with PE were stratified into subgroups according to the severity [mild PE (n=12) and severe PE (n=31)] and onset-time of the disease [early PE (n=19) and late PE (n=24)]. Plasma levels of sEng TGF-β1, sTNF-R1 and sTNF-R2 were determined by ELISA. The results showed that sEng and sTNF-R1 levels were higher in preeclamptic than in normotensive pregnant (sEng:  $p < 0.001$ , sTNF-R1:  $p = 0.014$ ) and non-pregnant (all  $p < 0.001$ ), and in normotensive pregnant compared with non-pregnant (all  $p < 0.001$ ). sTNF-R2 levels were higher in preeclamptic compared with non-pregnant ( $p < 0.001$ ), but no difference was found comparing with normotensive pregnant women. The same parameter was increased in normotensive pregnant compared with non pregnant women ( $p < 0.001$ ). No differences were found in TGF-β1 levels between the three studied groups. Late PE had higher levels of sTNF-R1 ( $p = 0.004$ ) and sTNF-R2 ( $p = 0.003$ ) than early PE and no significant difference was found for sEng and TGF-β1 levels. sEng levels were higher in severe PE comparing to mild PE ( $p = 0.005$ ) and no difference was found for TGF-β1, sTNF-R1 and sTNF-R2 levels. Logistic regression analysis revealed that primiparity and sEng plasma levels are independently associated with the development of PE. Furthermore, sEng levels are independently associated with the disease severity. No variable analyzed was independently associated with onset-time of the disease. These results suggest that sEng, sTNF-R1 and sTNF-R2 are associated with pregnancy, and that sEng and

sTNF-R1 are higher in preeclamptic women. In addition, these data suggest that elevated levels of both TNF- $\alpha$  receptors are associated with late PE, while higher levels of sEng are found in pregnant women with severe PE.

**Keywords:** Preeclampsia; sEng; TGF- $\beta$ 1; sTNF-R1; sTNF-R2.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Placentação anormal na pré-eclâmpsia.....	25
FIGURA 2 – Modelo hipotético do papel da Eng na expressão e ativação da enzima eNOS.....	28
FIGURA 3 – A proteína sEng causa disfunção endotelial ao inibir a sinalização do TGF- $\beta$ 1.....	30
FIGURA 4 – Representação esquemática da regulação da liberação de sTNF-R1 e o seu papel na regulação da ação do TNF.....	35
FIGURA 5 – Esquema simplificado da produção de receptores solúveis do TNF- $\alpha$ através da ativação da resposta imune mediada por células (imunidade tipo Th1) ..	38
FIGURA 6 – Níveis plasmáticos de sEng (A), TGF- $\beta$ 1 (B), sTNF-R1 (C) e sTNF-R2 (D) em mulheres não gestantes (grupo I), gestantes normotensas (grupo II) e gestantes com PE (grupo III).....	58
FIGURA 7 – Níveis plasmáticos de sEng (A), TGF- $\beta$ 1 (B), sTNF-R1 (C) e sTNF-R2 (D) em gestantes com PE precoce e tardia.....	59
FIGURA 8 – Níveis plasmáticos de sEng (A), TGF- $\beta$ 1 (B), sTNF-R1 (C) e sTNF-R2 (D) em gestantes com PE leve e grave.....	60
FIGURA 9 – Correlações entre os níveis de sTNF-R1 e sTNF-R2 em gestantes normotensas (grupo II) (A) e com PE (grupo III) (B).....	61
FIGURA 10 – Correlação entre os níveis de sEng e a idade gestacional em gestantes normotensas (grupo II).....	63
FIGURA 11 – Correlações estatisticamente significativas entre os níveis de sEng, sTNF-R1 e sTNF-R2 e as características clínicas das gestantes com PE (grupo III)	64
FIGURA 12 – Correlações estatisticamente significativas entre os níveis de sEng, sTNF-R1 e sTNF-R2 e os parâmetros laboratoriais das gestantes com PE (grupo III). .....	67

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Características clínicas das participantes do estudo .....	48
TABELA 2 – Características clínicas das gestantes com PE precoce (n=19) e PE tardia (n=24).....	49
TABELA 3 – Características clínicas das gestantes com PE leve (n=12) e PE grave (n=31).....	50
TABELA 4 – Parâmetros laboratoriais das gestantes com PE (grupo III, n=43) .....	52
TABELA 5 – Parâmetros laboratoriais das gestantes com PE precoce (n=19) e PE tardia (n=24).....	53
TABELA 6 – Parâmetros laboratoriais das gestantes com PE leve (n=12) e PE grave (n=31).....	54
TABELA 7 – Níveis plasmáticos de sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1 e sTNF-R2 em mulheres não gestantes, gestantes normotensas e gestantes com PE .....	55
TABELA 8 – Níveis plasmáticos de sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1 e sTNF-R2 em gestantes com PE de acordo com a idade gestacional na qual surgiram os sintomas da doença.....	56
TABELA 9 – Níveis plasmáticos de sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1 e sTNF-R2 em gestantes com PE de acordo com a gravidade da doença .....	57
TABELA 10 – Correlações entre os níveis plasmáticos de sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1 e sTNF-R2 em gestantes normotensas e com PE .....	61
TABELA 11 – Correlações entre os níveis plasmáticos de sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1 e sTNF-R2 e as características clínicas das gestantes normotensas e com PE .....	62
TABELA 12 – Correlações entre os níveis plasmáticos de sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1 e sTNF-R2 e os parâmetros laboratoriais das gestantes com PE .....	65
TABELA 13 – Modelo de regressão logística considerando como variável dependente a gestação com PE e a gestação normotensa .....	67
TABELA 14 – Modelo de regressão logística considerando como variável dependente a ocorrência de PE grave e PE leve .....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACOG	<i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>
ADAM-7	<i>A desintegrin and Metalloprotease 7</i>
ALK	Receptor cinase tipo ativina
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BMP	Proteína morfogenética óssea
BSA	Albumina sérica bovina
Ca	Cálcio
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CO	Monóxido de carbono
CID	Coagulação intravascular disseminada
CIUR	Crescimento intra-uterino restrito
Diast.	Diastólica
dL	Decilitro
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
End	Endoglina
<i>END</i>	Gene que codifica a endoglina
eNOS	Enzima sintase do óxido nítrico endotelial
FHEMIG	Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
g	Gramma
GPG	Ganho de peso na gestação
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HELLP	<i>Hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets</i>
HEPES	N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)
HHT	Telangiectasia hemorrágica hereditária
HOB	Hospital Odilon Behrens
HPRB	Hospital Público Regional de Betim
HRP	Estreptavidina- <i>horseradish</i> peroxidase
hs	Horas
Hsp 90	Proteína de choque térmico 90

IFN	Interferon
IG	Idade gestacional
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
IQ	Intervalo interquartil
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Kilodalton
Kg	Quilograma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monobásico de potássio
LDH	Lactato desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LSD	<i>Least square difference</i>
μL	Microlitro
M	Molar
m <sup>2</sup>	Metro quadrado
mg	Miligrama
MG	Minas Gerais
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm <sup>3</sup>	Milímetro cúbico
mmHg	Milímetro de mercúrio
MMP	Metaloproteinase de matriz
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
n.a.	Não se aplica
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
OPD	Ortofenilenodiamina
PA	Pressão arterial



PBS	Tampão fosfato salino
PE	Pré-eclâmpsia
pg	Picograma
PIGF	Fator de crescimento placentário
PMA	Miristato de forbol
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotação por minuto
r	Coeficiente de correlação de <i>Spearman</i>
Sem.	Semana
sEng	Endoglina solúvel
sFlt-1	Tirosina-cinase tipo fms-1 solúvel
Sist.	Sistólica
sTNF-R	Receptor solúvel do fator de necrose tumoral
TACE	Enzima conversora de fator de necrose tumoral alfa
TAPI-2	Inibidor de protease 2 de fator de necrose tumoral alfa
TCLÉ	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformante beta
Th	Célula T auxiliar
TIMP	Inibidor tecidual de metaloprotease
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
Treg	Célula T regulatória
T $\beta$ R	Receptor de superfície do fator de crescimento transformante beta
U	Unidade
UBSF	Unidade Básica de Saúde da Família
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF	Fator de crescimento endotelial
vs.	<i>Versus</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\beta$	Beta
$\alpha$	Alfa
$<$	Menor
$\geq$	Maior ou igual
$+$	Positivo; mais
$\gamma$	Gama
$\%$	Porcentagem
$>$	Maior
$-/-$	Nulo
$+/-$	Heterozigoto ou haploinsuficiente
$^{\circ}\text{C}$	Grau centígrado
$-$	Negativo
$\mu$	Micro
$\chi^2$	Qui-quadrado
$\leq$	Menor ou igual

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA .....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	21
2.1 Pré-eclâmpsia .....	21
2.2 Fator de crescimento transformante beta-1 (TGF- $\beta$ 1) e endogлина (Eng) .....	26
2.2.1 <i>Papel do TGF-<math>\beta</math>1 e da Eng na angiogênese</i> .....	27
2.2.2 <i>Papel do TGF-<math>\beta</math>1 na regulação da resposta imune</i> .....	29
2.2.3 <i>TGF-<math>\beta</math>1 e sEng na pré-eclâmpsia</i> .....	29
2.3 Receptores solúveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).....	32
2.3.1 <i>Papel dos receptores solúveis do TNF-<math>\alpha</math> na inflamação</i> .....	32
2.3.2 <i>Papel do TNF-<math>\alpha</math> e dos seus receptores solúveis na disfunção endotelial</i> ..	36
2.3.3 <i>Receptores solúveis do TNF-<math>\alpha</math> na pré-eclâmpsia</i> .....	37
3 OBJETIVOS .....	39
3.1 Objetivo geral .....	39
3.2 Objetivos específicos .....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	40
4.1 Aspectos éticos .....	40
4.2 Casuística .....	40
4.2.1 <i>Seleção das integrantes do estudo</i> .....	40
4.2.2 <i>Critérios de inclusão</i> .....	41
4.2.3 <i>Critérios de exclusão</i> .....	42
4.3 Material .....	43
4.3.1 <i>Amostra biológica</i> .....	43
4.4 Métodos .....	43
4.4.1 <i>Ensaio imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA)</i> .....	43
4.5 Análise estatística .....	47

5 RESULTADOS .....	48
5.1 Características clínicas dos grupos avaliados.....	48
5.2 Avaliação dos parâmetros laboratoriais das gestantes com PE.....	52
5.3 Avaliação de sEng, TGF- $\beta$ 1 e dos receptores solúveis do TNF- $\alpha$ .....	55
5.4 Correlações entre sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1 e sTNF-R2 em gestantes normotensas e em gestantes com PE .....	61
5.5 Correlações entre sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1, sTNF-R2 e as características clínicas das gestantes normotensas e com PE.....	62
5.6 Correlações entre sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1, sTNF-R2 e os parâmetros laboratoriais das gestantes com PE .....	64
5.6 Correlações entre sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1 e sTNF-R2 e os parâmetros laboratoriais das gestantes com PE.....	65
5.7 Análise multivariada de regressão logística dos parâmetros clínicos e dos fatores solúveis dosados.....	67
6 DISCUSSÃO .....	69
6.1 Características clínicas dos grupos avaliados.....	69
6.2 Parâmetros laboratoriais do grupo III .....	70
6.3 Fator de crescimento transformante beta-1 (TGF- $\beta$ 1) e endogлина solúvel (sEng) .....	72
6.4 Receptores solúveis do TNF- $\alpha$ .....	77
6.5 Considerações finais.....	81
6.6 Perspectivas de estudos futuros .....	82
6.7 Limitações do estudo .....	82
7 CONCLUSÕES .....	83
REFERÊNCIAS.....	84
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais .....	100
ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte.....	101
ANEXO C – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG).....	102

ANEXO D – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Municipal Odilon Behrens.....	103
ANEXO E – Declaração da Gerência da Unidade Básica de Saúde da Família (UBSF) Guanabara / Betim .....	104
ANEXO F – Declaração da Diretoria do Hospital Público Regional de Betim .....	105
ANEXO G – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os grupos I, II e III .....	106
ANEXO H – Fichas clínicas dos grupos I, II e III .....	109
ANEXO I – Apresentação do trabalho em eventos científicos.....	113

## 1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA

Doenças hipertensivas da gravidez são responsáveis por elevada morbidade e mortalidade materna e fetal. Esse grupo de doenças inclui a pré-eclâmpsia (PE), a hipertensão arterial crônica (de qualquer etiologia), a PE sobreposta à hipertensão arterial crônica, a eclâmpsia e a hipertensão gestacional. A PE, em sua forma pura, é caracterizada pelo aparecimento de hipertensão e proteinúria em gestantes normotensas, após a vigésima semana de gestação. A doença pode evoluir para outras manifestações clínicas mais sérias como a eclâmpsia, a síndrome HELLP (*hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets*) e a coagulação intravascular disseminada (CID).

A PE ocorre somente na presença da placenta, com ou sem o feto. O único tratamento efetivo para essa doença consiste na interrupção da gravidez e na retirada da placenta, o que contribui significativamente para a prematuridade e o baixo peso fetal. A PE está ainda associada a um elevado custo social, uma vez que, frequentemente, resulta na internação da gestante e do recém-nascido por um longo período.

Acredita-se que a PE seja uma doença multifatorial e que a sua patogênese envolva distúrbios de placentação, intolerância aos antígenos paternos presentes na placenta pelo sistema imune materno, dano endotelial progressivo e inflamação sistêmica materna excessiva.

Um desequilíbrio de fatores angiogênicos endógenos parece desempenhar um papel fundamental na patogênese da PE. Níveis diminuídos do fator de crescimento endotelial (VEGF) e do fator de crescimento placentário (PlGF), associados a níveis aumentados das formas solúveis das proteínas endoglin (sEng) e tirosina-quinase tipo fms-1 (sFlt-1) têm sido observados antes e depois do surgimento dos sintomas da doença.

A gravidez normal está associada a um estado inflamatório, o qual é exacerbado na PE. Vários estudos relatam níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina (IL)-6, interferon (IFN)- $\gamma$  e fator de necrose tumoral alfa (TNF)- $\alpha$ , em gestantes com PE em comparação às gestantes normotensas.

Ultimamente, tem sido extensamente discutido qual seria a melhor maneira de definir a síndrome materna da PE, e como diferenciar as formas leve e grave da

doença. Recentemente, foi proposta uma nova classificação da doença baseada na idade gestacional na qual surgem os sintomas, a saber: PE precoce e PE tardia (<34 semanas e  $\geq 34$  semanas de gestação, respectivamente). Essa classificação reflete melhor o prognóstico da PE.

A PE precoce tem sido associada a sinais de placentação anormal, evidenciados por alterações no doppler de artérias uterinas e restrição do crescimento fetal, bem como a um pior prognóstico materno. Por outro lado, a PE tardia parece estar menos relacionada à placentação anormal, e sugere-se que seja determinada principalmente por fatores maternos.

Deve-se salientar que, até hoje, nenhum sistema de classificação da doença foi capaz de identificar, independentemente, as gestantes e os fetos que têm risco aumentado de desenvolver as complicações que tornam a PE uma doença tão importante.

Considerando a complexidade da PE, bem como as lacunas existentes na literatura, este estudo se justificou plenamente e contribuiu para um melhor entendimento da sua fisiopatologia.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Pré-eclâmpsia

A pré-eclâmpsia (PE) é uma doença multissistêmica caracterizada pelo aparecimento de hipertensão e proteinúria em grávida normotensa após a vigésima semana de gestação que acomete cerca de 5 a 8% das gestações em todo o mundo (LAIN; ROBERTS, 2002). Sua prevalência varia em diferentes populações e em diferentes grupos étnicos (LAIN; ROBERTS, 2002). No Brasil, cerca de 40% das causas de morte obstétricas diretas são atribuídas a distúrbios hipertensivos da gravidez (LAURENTI; JORGE; GOTLIEB, 2004).

A PE é considerada uma doença heterogênea, com um espectro clínico que varia desde uma forma leve até uma forma grave e pode se acompanhar por diferentes sinais e sintomas (*American College of Obstetricians and Gynecologists*, ACOG, 2002). Na maior parte dos casos, a progressão é lenta, os sintomas aparecem tardiamente e a doença não evolui para a forma mais grave. Em outros casos, porém, a doença progride rapidamente, da forma leve para a forma grave em poucos dias ou meses, e pode se manifestar precocemente.

Diversos fatores maternos estão associados ao risco de desenvolvimento da PE, como primeira gravidez; PE em gestação anterior; extremos da faixa fértil; comorbidades associadas a dano endotelial, tais como diabetes mellitus e hipertensão arterial crônica; índice de massa corporal (IMC) > 30 antes da gestação e etnia negra (TROGSTAD; MAGNUS; STOLTENBERG, 2011). Além disso, acredita-se que exista um fator de risco paterno, uma vez que a má adaptação materna aos antígenos fetais presentes na placenta parece estar envolvida na patogênese dessa doença. O estudo de ASTIN; SCOTT; WORLEY (1981) relatou a morte de duas mulheres decorrente de pré-eclâmpsia que, em momentos diferentes, engravidaram de um mesmo homem.

Fumar durante a gravidez, ao contrário, tem sido considerado um fator protetor para o desenvolvimento de PE, embora os mecanismos envolvidos neste efeito sejam desconhecidos. O risco relativo é de aproximadamente 0,5 a 0,8 em gestantes fumantes quando comparadas às gestantes não fumantes (CONDÉ-AGUDELO *et al.*, 1999; ENGLAND; ZHANG, 2007). Várias teorias têm sido propostas para explicar o efeito protetor do tabagismo. O fumo do cigarro contém



substâncias que exercem efeitos hipotensores, como o tiocianato. A nicotina presente no fumo do cigarro pode inibir a produção de tromboxano, um vasoconstritor e agregante plaquetário potente. O monóxido de carbono (CO), produto de combustão do fumo do cigarro, diminui a agregação plaquetária e estimula a vasodilatação do endotélio. O tabagismo crônico também pode induzir eventos endoteliais sistêmicos que dessensibilizam o endotélio aos agentes causadores de disfunção endotelial na PE, como as espécies reativas de oxigênio (ROS). Apesar de reduzir a incidência da PE, o tabagismo está associado ao aumento do risco de mortalidade perinatal, aborto espontâneo, descolamento prematuro de placenta e retardo de crescimento intra-uterino (BAINBRIDGE; SIDLE; SMITH, 2005; CNATTINGIUS *et al.*, 1997; TROGSTAD; MAGNUS; STOLTENBERG, 2011).

De acordo com o *Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy* (2000) e o *ACOG Practice Bulletin* (2002), os parâmetros diagnósticos da PE são:

- Hipertensão: pressão arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg ou pressão arterial diastólica  $\geq 90$  mmHg, em no mínimo duas ocasiões.
- Proteinúria: excreção de proteína  $\geq 0,3$ g em urina de 24 horas ou  $\geq 30$ mg/dL ( $\geq 1+$  pelo método semi-quantitativo de fita), em amostra isolada de urina.

A medida da pressão arterial está sujeita a alterações associadas à ausência de repouso prévio, à postura corporal e ao estado emocional. A proteinúria é normalmente detectada por meio de fita reagente, uma vez que a sua determinação em uma amostra de urina de 24 horas é um método demorado. A detecção da proteinúria por meio de fita reagente pode fornecer resultados falsamente positivos se a urina estiver muito alcalina ou contaminada com amônia quaternária, clorhexidina, bem como pelo corrimento vaginal (DAVEY; MACGILLIVRAY, 1988). Além disso, a utilização da proteinúria como um critério diagnóstico da PE é controversa na literatura, pois em alguns casos a doença pode se estabelecer mesmo se a gestante apresentar níveis dentro dos valores de referência.

O edema já foi valorizado como critério para diagnóstico de PE, mas como ocorre frequentemente em mulheres com gestações saudáveis, deixou de ser incluído.

Tradicionalmente, a PE é classificada de acordo com a gravidade dos sinais clínicos e laboratoriais em PE leve e PE grave. Os parâmetros diagnósticos da PE leve são pressão sistólica  $\geq 140$  mmHg ou pressão arterial diastólica  $\geq 90$  mmHg, e

excreção de proteína  $\geq 0,3\text{g}$  e  $< 2\text{g}$  em uma urina de 24 horas ou  $\geq 1+$  pelo método semi-quantitativo de fita, em amostra isolada de urina. Os parâmetros diagnósticos da PE grave são pressão arterial sistólica  $\geq 160$  mmHg ou pressão arterial diastólica  $\geq 110$  mmHg, e excreção de proteína  $\geq 2$  g em urina de 24 horas ou  $\geq 2+$  pelo método semi-quantitativo de fita, em amostra isolada de urina. A PE grave frequentemente é acompanhada por um ou mais dos seguintes sinais e sintomas: distúrbios cerebrais e visuais, dor epigástrica, oligúria, edema pulmonar, níveis anormais de enzimas hepáticas, trombocitopenia e restrição de crescimento fetal.

Nos últimos anos, tem sido valorizada a classificação da PE de acordo com a idade gestacional na qual surgem os sintomas da doença. Dessa forma, a PE é classificada em precoce, quando os sintomas surgem antes de 34 semanas e tardia, quando surgem na 34<sup>a</sup> semana ou após este período. Estudos sugerem que a PE precoce e tardia possuem fisiopatologias diferentes e que deveriam ser estudadas individualmente (SOTO *et al.*, 2012). A PE precoce é clinicamente mais grave a curto e a longo prazo, tanto para a saúde da mãe quanto do filho, que a PE tardia (HALL *et al.*, 2000; MACKAY; BERG; ATRASH, 2001).

A PE pode ter desfechos ainda mais graves, como a eclâmpsia, síndrome HELLP (*hemolysis, elevated liver enzyme and low platelets*) e coagulação intravascular disseminada (CID).

A eclâmpsia afeta cerca de 2% das gestantes com PE grave e é caracterizada por crises epiléticas que não podem ser atribuídas a outras causas (CUNNINGHAM, 2000). Grande parte das gestantes com eclâmpsia apresenta, além de hipertensão e proteinúria, náuseas, vômitos, edema cerebral, cefaleia intensa e alterações mentais antes das crises epiléticas (YOUNG; LEVINE; KARUMANCHI, 2010). Assim como a PE, a fisiopatologia da eclâmpsia ainda é desconhecida, podendo se manifestar antes, durante ou após o parto. A isquemia ou hemorragia cerebrais constituem as principais causas de morte decorrentes da eclâmpsia (SIBAI, 2005).

A síndrome HELLP afeta aproximadamente 20% das gestantes com PE grave (SIBAI *et al.*, 1993, SIBAI, 2012). No período pós-parto, a síndrome geralmente se desenvolve dentro das primeiras 48 horas em mulheres que tiveram PE antes do parto (ONYANGUNGA; MOODLEY, 2012). A hipertensão está presente na maior parte dos casos, porém os sinais da PE podem ser sutis ou, até mesmo, estar ausentes (ABILDGAARD; HEIMDAL, 2013). Dessa forma, tem sido proposto que essa síndrome seja uma entidade não relacionada à PE. A lesão endotelial, ativação

das plaquetas, hemólise e lesão hepática são características fisiopatológicas da síndrome HELLP, as quais podem predispor à CID (BICK, 2000).

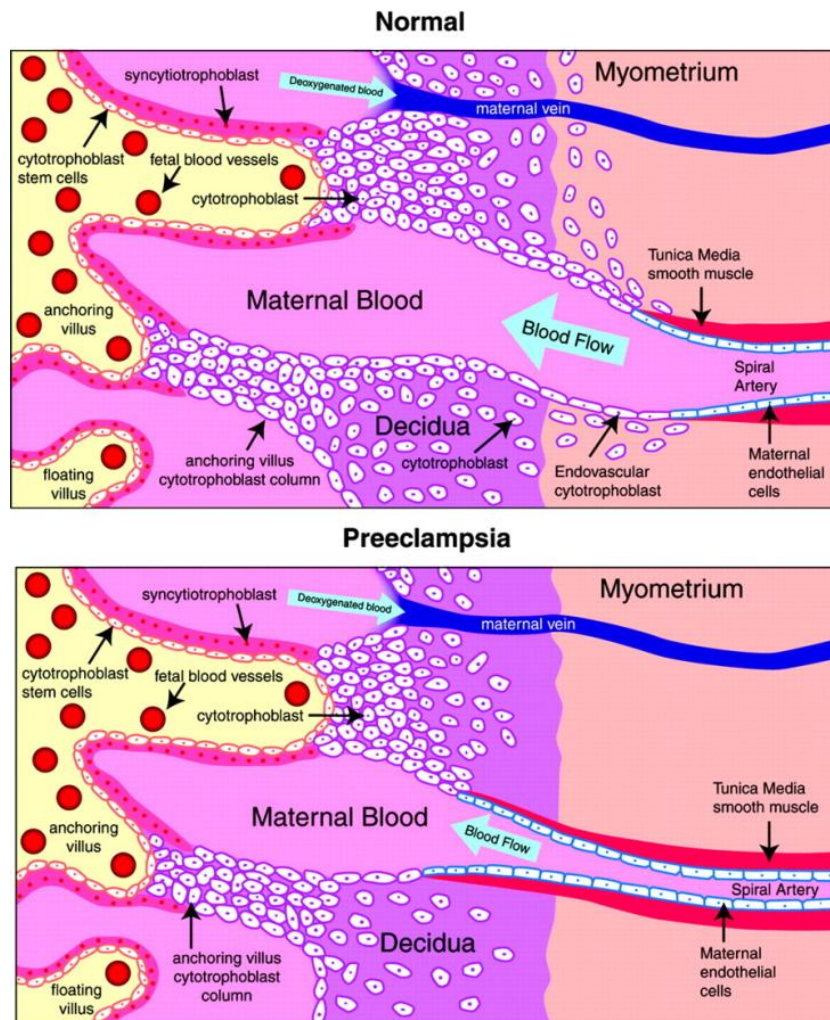
A CID ocorre quando há um desequilíbrio hemostático e a atividade pró-coagulante predomina sobre a anticoagulante. GALTON; MERRITT; BELLER (1971), foram os primeiros investigadores que relataram depósitos anormais de fibrina nas vilosidades placentárias e no endotélio dos capilares glomerulares de gestantes com PE e CID. Na PE, há um aumento dos níveis plasmáticos de dímeros D, complexo trombina-antitrombina, trombomodulina, fator de von Willebrand, fator VIII, acompanhado pela diminuição de antitrombina e da contagem de plaquetas (DUSSE *et al.*, 2013; LURIE; FEINSTEIN; MAMET, 2000). A CID inclui ainda a lise de hemácias pela ativação do sistema do complemento, hemorragia decorrente de coagulopatia de consumo e hipovolemia/hipotensão consequente à hemorragia e/ou liberação de bradicinina (FINLEY, 1989).

Embora os sintomas da PE se manifestem após a vigésima semana de gestação, atualmente têm sido aceito que a sua patogênese é estabelecida muito antes e envolve duas fases distintas.

A primeira fase (placentária) se dá no primeiro ou segundo trimestre de gestação, é assintomática e caracterizada por placentação deficiente (**FIGURA 1**). No desenvolvimento placentário normal, o citotrofoblasto invasivo de origem fetal invade as artérias espiraladas uterinas, transformando os vasos de alta resistência e pequeno calibre, em vasos de alta capacitância e grande calibre, capazes de fornecer uma perfusão placentária adequada ao desenvolvimento fetal. Na PE, o citotrofoblasto é incapaz de adotar um fenótipo invasivo e a invasão das artérias espiraladas é incompleta. Conseqüentemente, os vasos permanecem de calibre pequeno e alta resistência, o que resulta em hipoperfusão e isquemia placentárias. A placenta isquêmica libera fatores solúveis na circulação materna que causam disfunção endotelial sistêmica e resposta inflamatória excessiva (KHONG *et al.*, 1986; LAM; LIM; KARUMANCHI, 2005; WALKER, 2000).

A segunda fase (materna), que ocorre no terceiro trimestre de gestação, é caracterizada pelas manifestações clínicas da doença. A perda do controle endotelial do tônus vascular leva à hipertensão e o aumento da permeabilidade vascular glomerular causa proteinúria. A expressão anormal pelo endotélio lesado de fatores envolvidos na coagulação, a ativação e a agregação plaquetárias resultam em hipercoagulabilidade. Além disso, a vasoconstrição e a isquemia

decorrentes da lesão endotelial podem causar disfunção hepática (KHONG *et al.*, 1986; LAM; LIM; KARUMANCHI, 2005; WALKER, 2000).



**FIGURA 1 – Placentação anormal na pré-eclâmpsia. Parte superior da figura: gestação normotensa. Parte inferior da figura: gestação com PE. Fonte: LAM; LIM; KARUMANCHI, 2005.**

A conduta clínica nas gestantes com PE, principalmente naquelas com a forma precoce e grave, inclui a prevenção de crises epiléticas e o controle da hipertensão. Entretanto, o tratamento definitivo da doença consiste na interrupção da gravidez e retirada completa da placenta, no momento mais prudente, tanto para a gestante, quanto para o feto. Frequentemente, a equipe obstétrica opta por adiantar o parto visando garantir o bem estar da gestante (AAGARRD-TILLERY; BELFORT, 2005).

Mulheres identificadas com um alto risco para desenvolver PE podem se beneficiar com intervenções preventivas. As estratégias atuais para a avaliação de

risco são baseadas na história médica e obstétrica da gestante. Infelizmente, ainda não existem testes laboratoriais confiáveis que sejam capazes de identificar o risco real de desenvolver PE associado aos fatores individuais. Várias estratégias de prevenção de PE em gestantes com alto risco têm sido sugeridas, incluindo o uso de antiplaquetários e doadores ou precursores de óxido nítrico (NO); terapia antioxidante com vitaminas C e E; suplementação da dieta com cálcio, alho e óleo marinho e redução do consumo de sal. Apesar da variedade de intervenções profiláticas descritas na literatura, a maioria dos estudos têm produzido resultados desapontadores (BEZERRA MAIA E HOLANDA MOURA *et al.*, 2012).

## **2.2 Fator de crescimento transformante beta-1 (TGF- $\beta$ 1) e endogлина (Eng)**

A superfamília do fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) é composta por mais de 30 fatores de crescimento relacionados estruturalmente, que incluem os TGF- $\beta$ s (1-3), as ativinas (A e B), as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs 1-20), além de fatores de crescimento e diferenciação, como a miostatina (DE CAESTECKER, 2004). Essa classe de proteínas é expressa praticamente em todas as células do corpo humano e regula diversos processos celulares, como proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência, bem como processos fisiológicos, como desenvolvimento embrionário, angiogênese e cicatrização (GORDON; BLOBE, 2008).

Os receptores de TGF- $\beta$  incluem os receptores de superfície tipo I (T $\beta$ RI, ou receptores cinase tipo ativina - ALKs) e tipo II (T $\beta$ RII). Esses receptores estão localizados em células endoteliais, musculares lisas e em uma variedade de outros tipos celulares. Há ainda inúmeros co-receptores, como o betaglicano (T $\beta$ RIII), que podem regular a sinalização celular dos receptores da superfamília do TGF- $\beta$ , após a sua interação com ligantes específicos (DERYNCK; ZHANG, 1996; GORDON; BLOBE, 2008; GOUMANS *et al.*, 2002; MASSAGUÉ *et al.*, 1990). Todas as isoformas do TGF- $\beta$  interagem com os dois tipos de receptores, porém com diferentes afinidades (MCCARTNEY-FRANCIS; WAHL, 1994).

A endogлина (Eng), ou CD105, é uma glicoproteína homodimérica transmembranar que também atua como um co-receptor para múltiplos complexos receptores da superfamília do TGF- $\beta$  (BARBARA; WRANA; LETARTE, 1999). A estrutura primária da Eng é composta por uma região extracelular de 561

aminoácidos, um domínio hidrofóbico transmembranar, e uma cauda citoplasmática com 47 resíduos (GOUGOS; LETARTE; 1990). A porção extracelular da Eng pode interagir com as proteínas TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, ativina-A, BMP-2 e BMP-7 (BARBARA; WRANA; LETARTE, 1999).

### **2.2.1 Papel do TGF- $\beta$ 1 e da Eng na angiogênese**

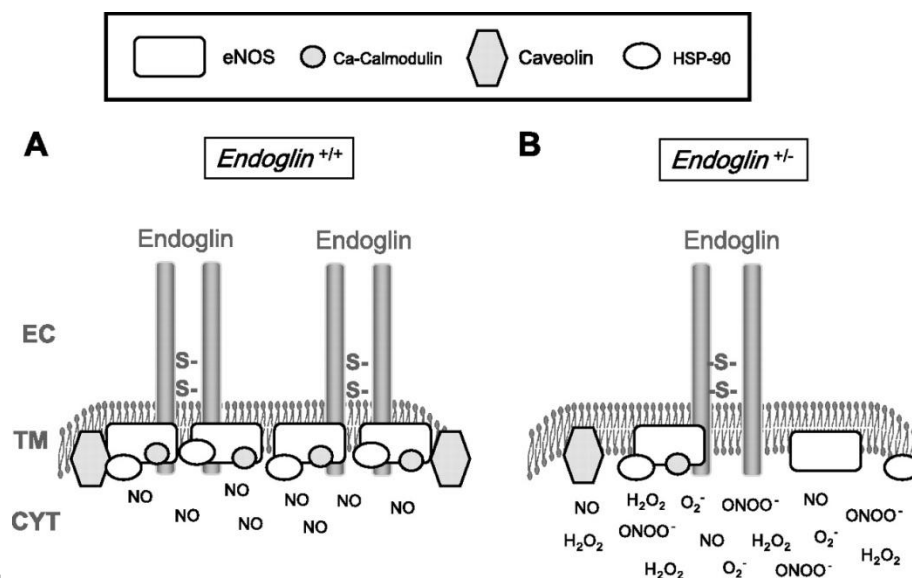
Tanto propriedades pró-angiogênicas, quanto anti-angiogênicas têm sido atribuídas às proteínas da superfamília TGF- $\beta$ . No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais essas atuam permanecem obscuros. O TGF- $\beta$ , de modo geral, inibe a proliferação das células endoteliais *in vitro*, porém efeitos estimulatórios na angiogênese são relatados *in vivo* (GOUMANS *et al.*, 2002). Os membros da superfamília TGF- $\beta$  também podem estimular a produção de outros fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial (VEGF) (DECKERS *et al.*, 2002).

Das três isoformas do TGF- $\beta$ , a isoforma TGF- $\beta$ 1 parece ser a mais importante para a angiogênese em mamíferos, uma vez que é expressa nas células endoteliais durante a embriogênese. Estudos mostraram que camundongos deficientes para os genes do TGF- $\beta$ 2 ou do TGF- $\beta$ 3 exibem uma angiogênese relativamente normal, enquanto a deficiência do TGF- $\beta$ 1 pode resultar em diferentes fenótipos, dependendo da herança genética. Por exemplo, nos camundongos C57BL/6, a angiogênese é anormal e os embriões morrem no 10º dia embrionário, enquanto nos camundongos NIH, o sistema cardiovascular tende a desenvolver-se normalmente, mas os neonatos morrem devido à resposta auto-imune descontrolada (TEN DIJKE; ARTHUR; 2007).

Apesar do papel funcional da Eng ainda não ser completamente entendido, vários estudos sugerem o seu envolvimento na angiogênese, no desenvolvimento vascular e na manutenção da integridade do endotélio vascular (FONSATTI; MAIO, 2004). Mutações no gene que codifica a Eng (*END*) estão associadas à telangiectasia hemorrágica hereditária tipo 1 (HHT1), uma doença caracterizada por malformações arteriovenosas que podem resultar em hemorragias recorrentes (GUTTMACHER; MARCHUK; WHITE, 1995; MCALLISTER *et al.*, 1994). Camundongos sem expressão para ambos os alelos *END* (*END*<sup>-/-</sup>) morrem na metade da gestação devido a disfunções no processo de angiogênese e ao

desenvolvimento cardiovascular defeituoso, enquanto camundongos *END* heterozigotos (*END<sup>+/-</sup>*) têm expectativa de vida normal, mas desenvolvem sinais de HHT1 (BOURDEAU; DUMONT; LETARTE, 1999; LI D. *et al.*, 1999; TORSNEY *et al.*, 2003).

A Eng é uma molécula com atividade anti-angiogênica que evita a apoptose de células endoteliais hipóxicas e é um componente essencial do complexo de ativação da enzima sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS), como representado na **FIGURA 2** (JERKIC *et al.*, 2004; LI C. *et al.*, 2000, 2003). A transcrição da eNOS é regulada por diversos mediadores e fatores de crescimento, como o TGF- $\beta$ 1 (LÓPEZ-NOVOA; BERNABEU, 2010).



**FIGURA 2 – Modelo hipotético do papel da Eng na expressão e ativação da enzima eNOS. EC: domínio extracelular; TM: domínio transmembrana; CYT: domínio citoplasmático. (A) A Eng reside na cavéola de células endoteliais *Endoglin<sup>+/+</sup>*, um domínio da membrana plasmática que contém caveolina (*caveolin*) e eNOS. A Eng facilita a associação entre a calmodulina ligada ao cálcio (*Ca-Calmodulin*) e a proteína de choque térmico 90 (*Hsp90*) à eNOS durante a ativação endotelial, o que resulta na produção de grande quantidade de NO e, conseqüentemente, em vasodilatação. (B) Nas células endoteliais haploinsuficientes (*Endoglin<sup>+/-</sup>*), tanto a quantidade de eNOS, quanto a associação da eNOS/Hsp90/calmodulina estão reduzidas. Assim, há menor produção de NO, maior desacoplamento de eNOS e maior formação de ânion superóxido ( $O_2^-$ ). O  $O_2^-$ , por sua vez, produz peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e reage com o NO para gerar peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Assim, a remoção de NO vasodilatador e a presença de radicais de oxigênio livres leva a uma desregulação do tônus vasomotor. Fonte: LÓPEZ-NOVOA; BERNABEU, 2010.**

Por outro lado, a forma solúvel da Eng (sEng) tem ação anti-angiogênica ao impedir a ligação do TGF- $\beta$ 1 aos seus receptores nas células endoteliais, o que resulta na menor ativação de eNOS e menor produção de NO, um vasodilatador

potente e, conseqüentemente, no aumento da resistência vascular (VENKATESHA *et al.*, 2006).

### **2.2.2 Papel do TGF- $\beta$ 1 na regulação da resposta imune**

O TGF- $\beta$ 1 é uma citocina multifuncional com atividade imunossupressora, bem como pró-inflamatória. Inicialmente, o TGF- $\beta$ 1 foi identificado como um agente quimiotático potente, capaz de induzir a migração de monócitos, linfócitos, neutrófilos e fibroblastos (MCCARTNEY-FRANCIS; WAHL, 1994). Mais tarde, vários estudos relataram que camundongos deficientes para o gene do TGF $\beta$ -1 morrem devido à inflamação multifocal e distúrbios autoimunes, sugerindo, então, o efeito imunossupressor dessa citocina no organismo (KULKARNI; KARLSSON, 1997).

As células T são consideradas os principais alvos da ação direta do TGF- $\beta$ 1 *in vivo* (LI; FLAVELL, 2008). Células T auxiliares (Th) *naïve* podem ser diferenciadas nas linhagens específicas Th1, Th2, Th17 e T reguladoras (Treg). As células Th1 estão envolvidas na imunidade celular, as células Th2 na imunidade humoral e na ativação de eosinófilos, as células Th17 protegem contra infecções fúngicas, virais e bacterianas e medeiam diferentes tipos de inflamação tecidual, enquanto as células Treg são importantes para a manutenção da auto-tolerância e para a regulação da inflamação (SAITO, 2010). O TGF- $\beta$ 1 induz tanto a geração de células Treg quanto de células Th17 a partir de células T *naïve*, enquanto a presença de IL-6 e IL-1 $\beta$  favorece a imunidade tipo Th17 e inibe a imunidade tipo Treg (GHORESCHI *et al.*, 2010; BETTELLI *et al.*, 2006). O desequilíbrio de células Treg e Th17 tem sido proposto como um mecanismo patogênico associado a várias doenças humanas (SAITO, 2010).

### **2.2.3 TGF- $\beta$ 1 e sEng na pré-eclâmpsia**

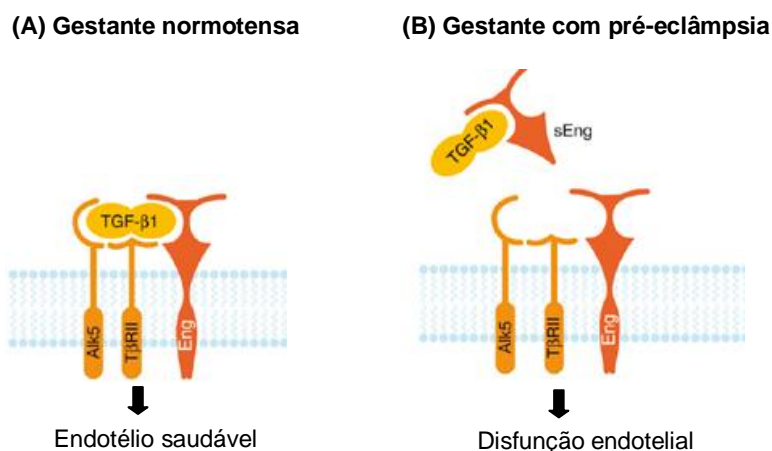
A trombocitopenia é um achado comum em gestantes com PE, podendo resultar da ativação plaquetária frequentemente observada nessa doença (MCCRAE, 2010). As plaquetas são as maiores fontes de TGF- $\beta$ 1 em humanos e, quando ativadas, liberam TGF- $\beta$ 1 dos seus grânulos  $\alpha$  na circulação sanguínea (ASSOIAN *et al.*, 1983). Assim, a detecção dos níveis circulantes dessa citocina



pode contribuir para o melhor entendimento do mecanismo envolvido na fisiopatologia da PE (PERAÇOLI *et al.*, 2008).

Acredita-se que o equilíbrio entre células Treg e Th17 seja importante para a manutenção da tolerância aos antígenos fetais herdados do pai e que a má adaptação imune materna a esses antígenos possa contribuir para a patogênese da PE (SAITO *et al.*, 2007; ZHAO; ZENG; LIU, 2007). O estudo conduzido por SANTNER-NANAN *et al.* (2009) relatou um aumento de células Treg e uma diminuição de células Th17 no sangue periférico de gestantes normotensas em relação a gestantes com PE. Ambas as células Treg e Th17 necessitam de TGF- $\beta$ 1 para se diferenciarem, o que reforça a importância do papel dessa citocina na patogênese da PE (GHORESCHI *et al.*, 2010; BETTELLI *et al.*, 2006).

VENKATESHA *et al.* (2006) foram os primeiros a destacar a importância da sEng na patogênese da PE e da síndrome HELLP em modelo animal e em mulheres. Nesse estudo, a administração de adenovírus codificado para sEng em ratas grávidas produziu hipertensão e proteinúria, que foram amplificadas pela co-administração de sEng e sFlt-1, gerando um modelo animal de PE grave associado à síndrome HELLP e a restrição do crescimento fetal. O sFlt-1 atua como antagonista do VEGF e do PlGF (MAYNARD *et al.*, 2003). Acredita-se que a sEng causa disfunção endotelial na PE ao impedir a ligação do TGF- $\beta$ 1 aos seus receptores de membrana, como representado na **FIGURA 3**. Assim, estes achados sugerem que a sEng e a sFlt-1, agindo por meio de diferentes mecanismos, contribuem sinergicamente para a patogênese da PE.



**FIGURA 3 – A proteína sEng causa disfunção endotelial ao inibir a sinalização do TGF- $\beta$ 1. (A) Gestante normotensa. (B) Gestante com PE. Fonte: Adaptado de KARUMANCHI; EPSTEIN, 2007.**

Diversos estudos relataram níveis aumentados de sEng na circulação de gestantes com PE antes e depois da doença se manifestar clinicamente, e esses níveis correlacionaram positivamente com a gravidade da doença (DE VIVO *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2009; REDDY *et al.*, 2009, VENKATESHA *et al.*, 2006). Além disso, foram detectados níveis elevados de sEng na urina e no líquido amniótico de gestantes com PE (BUHIMSCHI *et al.*, 2010; STAFF *et al.*, 2007). Por outro lado, o feto parece não contribuir para o aumento dos níveis de sEng na PE. STAFF *et al.* (2007), relataram níveis muito baixos de sEng no sangue venoso e no sangue arterial umbilical fetal, que não diferiram entre as gestantes com PE e as gestantes normotensas.

Por outro lado, os estudos que avaliaram os níveis circulantes do TGF- $\beta$ 1 em gestantes com PE apresentam resultados conflitantes (GIL-VILLA *et al.*, 2012; MADAZLI *et al.*, 2003; SZARKA *et al.*, 2010).

A Eng é expressa principalmente nas células vasculares endoteliais e nos sinciciotrofbastos da placenta (FONSATTI; MAIO, 2004; GOUGOS *et al.*, 2002). É, também, expressa nos citotrofbastos extravilosos e nos monócitos (LASTRES *et al.*, 1992; ST-JACQUES *et al.*, 1994). A placenta parece servir como a fonte mais abundante de sEng nas gestantes com PE e diversos estudos relataram um aumento da Eng placentária na PE (FANG *et al.*, 2010; JEYABALAN *et al.*, 2008, VENKATESHA *et al.*, 2006). Além disso, os níveis de sEng caem significativamente na circulação materna após o parto (PETROZELLA *et al.*, 2012; VENKATESHA *et al.*, 2006).

Ainda não se sabe ao certo como a sEng é liberada na circulação sanguínea das gestantes com PE. A sequência parcial da proteína sEng (65 kDa) purificada sugere que a mesma seja um produto da clivagem N-terminal da proteína transmembrana Eng (90kDa). Uma vez que o betaglicano, outro co-receptor do TGF- $\beta$  que tem uma sequência parcial idêntica a Eng, pode ser clivado por uma protease de membrana, pode-se especular um processamento semelhante para a sEng (VELASCO-LOYDEN; ARRIBAS; LÓPEZ-CASILLAS, 2004). Um estudo recente sugere que a metaloproteinase de matriz 14 (MMP-14) seja a protease envolvida na clivagem da Eng presente na placenta (KAITU'U-LINO *et al.*, 2012). Sabe-se que várias substâncias são produzidas em excesso pela placenta pré-eclâmptica, tais como restos de trofbastos e lipídeos oxidados e é possível que essas também promovam a liberação de sEng na circulação materna (REDMAN; SARGENT, 2005;

STAFF *et al.*, 1999; WALSH *et al.*, 2000). Além disso, proteases de leucócitos ativados podem clivar proteínas na sua porção N-terminal inativando-as. Isto ocorre com a Anexina A1, uma proteína anti-inflamatória induzida por esteroides (VAGO *et al.*, 2012).

Embora a PE seja tradicionalmente considerada uma doença autolimitada, que resolve uma vez que a placenta é retirada, alguns estudos sugerem que um estado anti-angiogênico persistente possa contribuir para a disfunção endotelial, com implicações futuras para a saúde da mulher. As mulheres que tiveram PE e suas filhas têm maior risco de desenvolver doenças cardiovasculares quando comparadas àquelas cujas mães permaneceram normotensas durante a gravidez. No entanto, no momento atual, ainda não está claro se a PE é um fator de risco formal para doenças cardiovasculares, ou se as mulheres que tiveram PE compartilham fatores de risco com outras mulheres que têm maior chance de desenvolver essas doenças (CRAICI; WAGNER; GAROVIC, 2008; GILBERT; NIJLAND; KNOBLICH, 2008; POWE; LEVINE; KARUMANCHI, 2011).

Em contrapartida, a persistência de níveis moderados de sEng na circulação pode exercer um efeito protetor contra o desenvolvimento de tumores no período pós-natal. Estudos epidemiológicos recentes relataram que mulheres que já tiveram PE e suas filhas têm uma incidência reduzida de câncer de mama, quando comparadas às mulheres que tiveram gestações normotensas e suas filhas (INNES; BYERS, 1999; TROISI; POTISCHMAN; HOOVER, 2007).

## **2.3 Receptores solúveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )**

### **2.3.1 Papel dos receptores solúveis do TNF- $\alpha$ na inflamação**

O TNF era um fator desconhecido que foi assim nomeado devido a sua habilidade de induzir necrose hemorrágica em alguns tipos de tumores (ROTHER *et al.*, 1992). O TNF foi isolado em 1984 e, desde então, é considerado uma das principais citocinas pró-inflamatórias com atividade pleiotrópica em vários órgãos e tipos celulares. É expresso como uma proteína transmembranar de 26KDa que pode ser clivada para liberar a sua forma solúvel de 17KDa (MACEWAN, 2002).

O papel primário do TNF consiste na regulação das células imunes, porém níveis excessivos estão envolvidos na patogênese de diversas doenças como artrite reumatoide, asma e choque séptico (MACEWAN, 2002). Estudos experimentais em animais, incluindo camundongos deficientes para o gene do TNF, demonstram a importância desse na defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares e na fase precoce da resposta imune (BROCKHAUS, 1997).

O termo TNF se refere a dois fatores relacionados, o TNF- $\alpha$  e o TNF- $\beta$ , cujas principais fontes são os monócitos/macrófagos e as células T ativadas. Existem dois receptores distintos de TNF, o TNFR tipo I (TNF-R1, também conhecido como TNFp55, TNFR $\beta$  ou CD120a) e TNFR tipo II (TNF-R2, também conhecido como TNFp75, TNFR $\alpha$  ou CD120b), os quais possuem massa molecular de 55kDa e 75kDa, respectivamente (BROCKHAUS, 1997; ROTHE *et al.*, 1992; VANDENABEELE *et al.*, 1995).

Apesar de todas as células nucleadas terem, virtualmente, a capacidade de expressar TNF-R1 e TNF-R2, a expressão dos genes que codificam esses dois receptores é regulada diferentemente em cada tipo celular (VANDENABEELE *et al.*, 1995). O TNF-R1 é expresso predominantemente em células sujeitas ao efeito citotóxico do TNF- $\alpha$ , enquanto o TNF-R2 é altamente expresso em células de origem mieloide, principalmente nas células T e B estimuladas (DIEZ-RUIZ *et al.*, 1995). A expressão celular dos receptores do TNF é regulada em resposta a isquemia e lesão teciduais, o que fornece um nível importante de controle das atividades biológicas do TNF (BOTCHKINA *et al.*, 1997).

A análise da sequência de aminoácidos desses dois receptores revelou um alto grau de similaridade entre as suas regiões extracelulares, ao passo que as suas regiões intracelulares se mostraram totalmente não relacionadas, o que sugere que esses dois receptores possam apresentar atividades funcionais distintas (BOTCHKINA *et al.*, 1997).

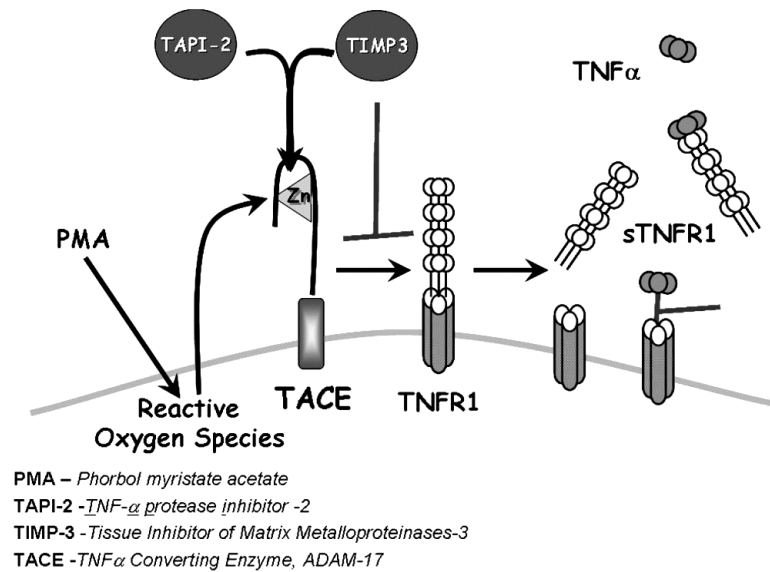
Estudos posteriores mostraram que o TNF-R1 medeia a morte celular por apoptose induzida por TNF. No entanto, a função do TNF-R2 é, ainda, obscura. O TNF-R2 tem sido implicado na proliferação celular e na proteção contra a morte, apesar de ser capaz de transduzir sinais apoptóticos em algumas linhagens celulares (BOTCHKINA *et al.*, 1997). Além disso, o TNF-R2 pode exercer uma função acessória ao se ligar ao TNF e transferi-lo para o TNF-R1 (BROCKHAUS, 1997). Os receptores do TNF não apresentam, por si só, capacidade de sinalização,

portanto devem interagir com proteínas intracelulares a fim de controlar a sinalização celular (MACEWAN, 2002).

Ambos os receptores liberam fisiologicamente na circulação a sua porção extracelular sob uma forma solúvel (sTNF-R), provavelmente através de clivagem proteolítica (NOPHAR *et al.*, 1990). A concentração de sTNF-R1 e de sTNF-R2 na circulação de indivíduos saudáveis é de 2000-3000 pg/mL e 2000-6000 pg/mL, respectivamente (BROCKHAUS, 1997). Neutrófilos, células T e monócitos ativados são as principais fontes de sTNF-Rs (DIEZ-RUIZ *et al.*, 1995). Ambos os receptores solúveis estão elevados na sepse e em infecções não bacterianas, como a malária. Uma elevação menos pronunciada é observada no câncer, nas infecções virais e nas doenças auto-imunes (BROCKHAUS, 1997).

Acredita-se que os sTNF-Rs neutralizam a atividade do TNF, uma vez que eles podem agir como antagonistas ou inibidores do TNF, bloqueando diretamente a sua ação ou competindo com a ligação do TNF aos receptores de superfície celular. Além disso, servem como proteínas carreadoras de TNF para fora do seu local de produção e estabilizam ou até mesmo aumentam os efeitos do TNF ao servir como reservatório de TNF bioativo, prolongando a sua atividade (DIEZ-RUIZ *et al.*, 1995). A função neutralizante do TNF exercida pelos sTNF-Rs é um mecanismo importante de regulação da atividade inflamatória de TNF (BROCKHAUS, 1997; COOK *et al.*, 2008).

A **FIGURA 4** ilustra a regulação da produção de sTNF-R1 e o seu papel na regulação da atividade do TNF.



**FIGURA 4 – Representação esquemática da regulação da liberação de sTNF-R1 e o seu papel na regulação da ação do TNF. A enzima conversora de TNF- $\alpha$  (TACE; também conhecida como metaloprotease e ADAM-17) cliva o TNF-R1 em sua forma solúvel (sTNF-R1). A clivagem proteolítica do TNF-R1 pela TACE pode ser ativada *in vivo* por ROS. O acetato miristato de forbol (PMA) é frequentemente utilizado para a estimulação da produção ROS *in vitro*. A clivagem proteolítica do TNF-R1 é inibida pelo inibidor tecidual de metaloprotease-3 (TIMP-3) e pelo inibidor de protease de TNF- $\alpha$  2 (TAPI-2). Fonte: COOK *et al.*, 2008.**

A determinação plasmática de sTNF-Rs apresenta várias vantagens em relação à determinação do TNF- $\alpha$ , uma vez que o TNF- $\alpha$  é rapidamente removido do organismo, sendo frequentemente indetectável. Além disso, alguns testes são incapazes de detectar o TNF- $\alpha$  ligado aos sTNF-Rs, resultando em medidas não confiáveis de TNF- $\alpha$ . Cumpre destacar que os sTNF-Rs são bastante estáveis, podendo ser determinados em amostras de soro/plasma estocadas e os níveis circulantes de sTNF-R1 e sTNF-R2 correlacionam com os níveis de TNF- $\alpha$  (BROCKHAUS, 1997; DIEZ-RUIZ *et al.*, 1995).

A estabilidade do TNF- $\alpha$  e dos seus receptores solúveis na circulação foi verificada *in vivo* pelo estudo de VAN ZEE *et al.* (1992). Este estudo utilizou um modelo de infecção humana, no qual foram administradas 20 unidades de endotoxina (LPS) a voluntários adultos saudáveis, considerado um estímulo inflamatório leve, e as suas amostras de plasma foram examinadas em diferentes intervalos após o desafio com LPS. O pico de concentração de TNF- $\alpha$  foi detectado 1 a 2 horas após a administração de LPS, tornando-se indetectável dentro de 4 horas. Em contrapartida, o pico de concentração dos receptores solúveis do TNF- $\alpha$  ocorreu entre 2 e 3 horas após a administração de LPS e os seus níveis

permaneceram detectáveis por até 24 horas. Este estudo também avaliou os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ , sTNF-R1 e sTNF-R2 em pacientes que tiveram episódios de choque hemorrágico ou sepse após sofrerem lesões traumáticas graves ou se submeterem a procedimentos cirúrgicos extensos. O TNF- $\alpha$  foi detectado em apenas 37% das amostras, enquanto o sTNF-R1 e o sTNF-R2 foram detectados em 94% e 89% das amostras, respectivamente.

### **2.3.2 Papel do TNF- $\alpha$ e dos seus receptores solúveis na disfunção endotelial**

A indução fisiológica de TNF- $\alpha$  é protetora, mas a sua superprodução parece causar lesão endotelial direta (TRACEY; CERAMI, 1993). A infusão intravenosa maciça de TNF humano recombinante purificado reproduz as características fundamentais do choque séptico induzido por endotoxina em ratos, como aumento da permeabilidade capilar, hemoconcentração, edema e hipotensão. Além disso, a liberação excessiva de TNF pode induzir a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, ROS e estimular a atividade pró-coagulante do endotélio (MUZAFFAR *et al.*, 2003; SLUNGAARD *et al.*, 1990).

Níveis elevados de TNF- $\alpha$  estão associados a menor expressão de eNOS e, conseqüentemente, à produção reduzida de NO, que além de vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária, possui ação moduladora da adesão de leucócitos no endotélio (ANDERSON; RAHMUTULA; GARDNER, 2004; KUBES; SUZUKI; GRANGER, 1991; RAPOPORT; DRAZNIN; MURAD, 1983). O TNF- $\alpha$  regula negativamente os níveis eNOS ao reduzir a atividade do promotor do seu gene e ao provocar a desestabilização do seu RNA mensageiro (mRNA) (ANDERSON; RAHMUTULA; GARDNER, 2004; MOHAMED *et al.*, 1995). Estudos *in vivo* em ratos relataram que a administração de TNF- $\alpha$  reduz os níveis de NO nas células endoteliais, interferindo, conseqüentemente, com o relaxamento do endotélio (WANG; BA; CHAUDRY, 1994).

Tais efeitos, em conjunto, provavelmente contribuem para a disfunção endotelial observada em diversas doenças as quais estão associadas ao aumento dos níveis circulatórios de TNF- $\alpha$ , como a PE.

Pode-se especular que os sTNF-Rs neutralizem, em parte, a capacidade do TNF- $\alpha$  de causar lesão endotelial, ao impedir a sua ligação aos seus receptores de membrana. Desta forma, a liberação de sTNF-Rs pode constituir um dos

mecanismos de controle da disfunção endotelial associada a níveis aumentados de TNF- $\alpha$  na circulação.

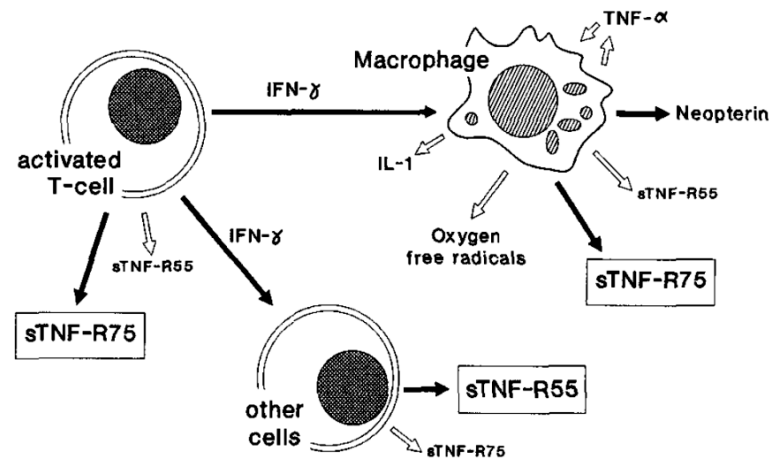
### **2.3.3 Receptores solúveis do TNF- $\alpha$ na pré-eclâmpsia**

Acredita-se que a resposta inflamatória sistêmica materna desempenhe um papel importante na patogênese da PE. O terceiro trimestre de gestação está associado, fisiologicamente, a uma maior resposta inflamatória quando comparado ao estado não gravídico, porém esta é ainda mais pronunciada na PE (REDMAN; SACKS; SARGENT, 1999). A liberação excessiva de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , pode prejudicar a função das células endoteliais, modular a expressão de moléculas de adesão celular e induzir a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias (SLUNGAARD *et al.*, 1990). As citocinas também têm um papel fundamental na invasão do trofoblasto nas artérias espiraladas uterinas (POLLHEIMER; KNÖFLER, 2012) e no início do trabalho de parto, ao induzir a síntese de prostaglandinas (LUNDIN-SCHILLER, MITCHELL, 1991).

Conforme descrito anteriormente (**seção 2.2.3**), as gestantes com PE apresentam um aumento de células Th17 e uma diminuição de células Treg. Somado a esse desequilíbrio, observa-se uma imunidade predominantemente do tipo Th1 em gestantes com PE, ao contrário de uma imunidade predominantemente do tipo Th2 em gestantes normotensas (SAITO, 2010).

Os produtos da resposta imune do tipo Th1, tais como o IFN- $\gamma$  e IL-2, ativam os macrófagos a secretarem TNF- $\alpha$ . Durante a resposta imune Th1, o sTNF-R2 é liberado principalmente por células mononucleares ativadas, como as células T e os macrófagos, ao passo que as outras células que respondem ao IFN- $\gamma$  liberam, preferencialmente, o sTNF-R1, como representado na **FIGURA 5** (DIEZ-RUIZ *et al.*, 1995; MAGGI *et al.*, 1992; ROMAGNANI, 1992).





**FIGURA 5 – Esquema simplificado da produção de receptores solúveis do TNF- $\alpha$  através da ativação da resposta imune mediada por células (imunidade tipo Th1). sTNF-R55 = sTNF-R1, sTNF-R75 = sTNF-R2. Fonte: DIEZ-RUIZ *et al.*, 1995.**

O paradigma Th1/Th2/Th17/Treg explica, em parte, a inflamação crônica, a tolerância inadequada ao feto e a angiogênese deficiente que estão envolvidos na fisiopatologia na PE (SAITO, 2010; SAITO *et al.*, 2010).

A maior parte dos estudos tem relatado níveis circulantes aumentados de sTNF-R1 e sTNF-R2 em gestantes com PE em comparação a gestantes normotensas (KUPFERMINC *et al.*, 1996; NÚÑEZ-GONZÁLEZ; SANABRIA-VERA; ROMERO-ADRIÁN, 2001; VISSER *et al.*, 2002). Por outro lado, os estudos que avaliaram os níveis de TNF- $\alpha$  apresentaram resultados heterogêneos. Enquanto alguns estudos relataram níveis elevados de TNF- $\alpha$  em gestantes com PE (KUPFERMINC *et al.*, 1994; NÚÑEZ-GONZÁLEZ; SANABRIA-VERA; ROMERO-ADRIÁN, 2001; VELZING-AARTS *et al.*, 2002), outros estudos não revelaram diferenças significativas entre gestantes com PE e gestantes normotensas (BOWEN *et al.*, 2001; PINHEIRO *et al.*, 2013).

Os receptores do TNF- $\alpha$  são expressos fisiologicamente na placenta durante toda a gestação. Nas placentas a termo, os mRNA do TNF-R1 é expresso principalmente no estroma viloso e nas células endoteliais. O mRNA do TNF-R2 têm uma distribuição placentária similar ao mRNA do sTNF-R1, porém em um menor nível de expressão (YELAVARTHI; HUNT, 1993). Os sTNF-Rs também têm sido detectados na urina e no líquido amniótico durante a gestação (ENGELMANN; NOVICK; WALLACH, 1990; OPSJØN *et al.*, 1995). Níveis elevados de ambos os receptores solúveis têm sido detectados no líquido amniótico de gestantes com PE (KUPFERMINC *et al.*, 1996).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a associação dos níveis plasmáticos de marcadores de angiogênese (sEng e TGF- $\beta$ 1) e inflamação (sTNF-R1 e sTNFR-2) em pacientes com PE e suas diferentes manifestações clínicas.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- 1) Avaliar e comparar os níveis de sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1 e sTNFR-2 entre:
  - a) Mulheres não gestantes, gestantes normotensas e gestantes com PE;
  - b) Gestantes com PE precoce e tardia; e
  - c) Gestantes com PE leve e grave.
- 2) Estabelecer a correlação entre os níveis plasmáticos de sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1 e sTNFR-2 e as características clínicas das gestantes normotensas e com PE.
- 3) Estabelecer a correlação entre os níveis plasmáticos de sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1 e sTNFR-2 e os parâmetros laboratoriais das gestantes com PE.
- 4) Realizar análise de regressão multivariada para estabelecer se os marcadores avaliados estão associados independentemente com a ocorrência de PE e suas diferentes manifestações clínicas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Aspectos éticos

Este projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (**ANEXO A**), pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte / Belo Horizonte - MG (**ANEXO B**), pelo Núcleo de Pesquisa da Maternidade Odete Valadares/Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG) / Belo Horizonte - MG (**ANEXO C**), pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Municipal Odilon Behrens (HOB) / Belo Horizonte – MG (**ANEXO D**), pela gerência da Unidade Básica de Saúde da Família (UBSF) Guanabara / Betim - MG (**ANEXO E**) e pela Diretoria do Hospital Público Regional de Betim (HPRB) / Betim – MG (**ANEXO F**).

O esclarecimento dos objetivos da pesquisa foi feito pelos pesquisadores, no momento da coleta do sangue, utilizando-se linguagem clara, a todas as mulheres participantes do estudo. Todas assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (**ANEXO G**).

### 4.2 Casuística

#### 4.2.1 *Seleção das integrantes do estudo*

Este estudo transversal incluiu 87 mulheres distribuídas em três grupos. O tamanho amostral utilizado neste estudo se baseou em estudos anteriores da literatura os quais avaliaram os mesmos marcadores, porém em populações diferentes. O grupo I foi composto por mulheres não gestantes (n=23), o grupo II, por gestantes normotensas (n=21) e o grupo III, por gestantes com o diagnóstico de PE (n=43). As gestantes com PE foram selecionadas na Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte / Belo Horizonte – MG, na Maternidade Odete Valadares / Belo Horizonte – MG, no Hospital Municipal Odilon Behrens / Belo Horizonte – MG e no Hospital Público Regional de Betim / Betim – MG. As mulheres dos grupos I e II foram selecionadas na Unidade Básica de Saúde da Família Guanabara / Betim – MG. As integrantes dos três grupos avaliados pertenciam à mesma classe social. O

protocolo da pesquisa não interferiu com as recomendações e prescrições médicas. Os dados clínicos e laboratoriais de interesse, de cada uma das participantes do estudo, foram coletados em ficha individual padronizada (**ANEXO H**), a partir do cartão de pré-natal e/ou prontuário médico e durante a entrevista presencial.

#### **4.2.2 Critérios de inclusão**

Os critérios de inclusão para as mulheres não gestantes (grupo I) foram:

- Pressão sistólica/diastólica igual ou inferior a 120 x 80 mmHg e sem história pregressa de hipertensão e PE;

Para as gestantes normotensas (grupo II), foram:

- Pressão sistólica/diastólica igual ou inferior a 120 x 80 mmHg e sem história pregressa de hipertensão e PE;
- Estar no terceiro trimestre de gestação.

De acordo com o *Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy* (2000) e o *ACOG Practice Bulletin* (2002), os critérios de inclusão adotados para as gestantes com PE (grupo III), foram:

- Pressão sistólica/diastólica igual ou superior a 140 x 90 mmHg, aferida em duas medidas com intervalo de, no mínimo, 2 horas e após repouso;
- Proteinúria superior a 0,3g em uma urina de 24 horas ou maior ou igual a 1+ pelo método semi-quantitativo de fita, em amostra isolada de urina;

As gestantes deste grupo também estavam no terceiro trimestre de gestação.

O diagnóstico de PE foi feito pela equipe obstétrica dos hospitais e maternidades nas quais as pacientes foram selecionadas

As gestantes com PE (grupo III) foram distribuídas em dois subgrupos, de acordo com a idade gestacional na qual surgiram os sintomas da doença (DEKKER *et al.*, 1995), sendo:

PE precoce: Quando os sintomas surgiram antes da 34<sup>a</sup> semana de gestação.

PE tardia: Quando os sintomas surgiram na 34<sup>a</sup> semana de gestação ou após esse período.

As gestantes com PE (grupo III) foram também distribuídas em dois subgrupos, de acordo a gravidade da doença (ACOG *Practice Bulletin*, 2002; *Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy*, 2000), sendo:

PE leve:

- Pressão sistólica/diastólica igual ou superior a 140 x 90 mmHg e inferior a 160 x 110 mmHg, aferida em duas medidas com intervalo de, no mínimo, 2 horas e após repouso.

PE grave:

- Pressão sistólica/diastólica igual ou superior a 160 x 110 mmHg, aferida em duas medidas com intervalo de, no mínimo, 2 horas e após repouso.

A presença de alguns dos sintomas clínicos e achados clínico-laboratoriais também foi considerada pela equipe obstétrica para definir o diagnóstico de PE grave, como:

- Dor epigástrica ou no abdome superior;
- Alterações visuais;
- Exacerbação dos reflexos tendinosos profundos, sendo aferidos por dois reflexos (patelar e de membros superiores);
- Cefaleia;
- Dispneia e sinais de congestão pulmonar;
- Volume urinário inferior a 500mL em 24hs ou 100mL em 4 horas (2 medidas);
- Trombocitopenia (contagem de plaquetas  $< 100.000 /\text{mm}^3$ );
- Elevação da atividade das enzimas hepáticas;
- Presença de esquizócitos no filme sanguíneo;
- Crescimento intra-uterino restrito (CIUR).

#### **4.2.3 Critérios de exclusão**

Os critérios de exclusão comuns aos três grupos foram:

- Obesidade (IMC  $> 30$ );
- Presença de doenças intercorrentes como hipertensão crônica, diabetes, câncer, distúrbios da coagulação, doenças cardiovasculares, autoimunes, hepáticas, renais e infectocontagiosas.

O trabalho de parto avançado também foi um critério de exclusão adotado para os grupos II e III.

A idade gestacional das participantes dos grupos II e III foi pareada, bem como a idade das participantes dos grupos I, II e III.

### **4.3 Material**

#### **4.3.1 Amostra biológica**

Foi coletado, de cada participante do estudo, 5mL de sangue venoso em EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), diretamente em tubos com o sistema *Vacurette*<sup>®</sup>, devidamente identificados. Essas amostras foram centrifugadas durante 15 minutos, a 3500 rpm e à temperatura ambiente para a obtenção de plasma, o qual foi imediatamente aliquotado em tubos criogênicos devidamente identificados. As alíquotas de plasma foram armazenadas à temperatura de -80°C até o momento da realização dos testes laboratoriais.

### **4.4 Métodos**

#### **4.4.1 Ensaio imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA)**

##### **4.4.1.1 ELISA para a determinação de sEng**

A determinação da concentração plasmática de sEng foi realizada pelo método de imunoenensaio quantitativo enzimático do tipo sanduíche, empregando-se o conjunto diagnóstico QUANTIKINE<sup>®</sup> Human Endoglin/CD 105 Immunoassay – ELISA (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN), de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras de plasma foram diluídas 1:6 antes da realização do teste.

O princípio do teste consiste na ligação da sEng presente na amostra de plasma a ser testada, ao anticorpo monoclonal específico para sEng pré-fixado na superfície de uma microplaca. Após a etapa de incubação dos padrões e das

amostras, a microplaca foi lavada para retirar os antígenos que não se ligaram e, em seguida, um anticorpo monoclonal específico para sEng conjugado à peroxidase foi adicionado. Após incubação, uma segunda lavagem foi realizada para remover os conjugados anticorpo-enzima que não se ligaram. Em seguida, o substrato tetrametilbenzidina (TMB), na presença de peróxido de hidrogênio, foi adicionado às cavidades da microplaca. A reação resultante foi observada pela formação de um produto corado e interrompida pela adição de ácido sulfúrico. A intensidade da cor produzida foi medida espectrofotometricamente em 450nm, com a correção do comprimento de onda ajustado para 540nm, e era proporcional à concentração de sEng no plasma.

A concentração de sEng de cada amostra foi obtida interpolando-se a absorbância lida em uma curva de calibração, conforme orientação do fabricante.

#### **4.4.1.2 ELISA para a determinação de TGF- $\beta$ 1**

A determinação da concentração plasmática de TGF- $\beta$ 1 foi realizada pelo método de imunoenensaio quantitativo enzimático do tipo sanduíche, empregando-se o conjunto diagnóstico QUANTIKINE<sup>®</sup> Human TGF- $\beta$ 1 Immunoassay – ELISA (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN), de acordo com as instruções do fabricante.

##### **4.4.1.2.1 Ativação e diluição das amostras**

Antes da realização do teste, as amostras de plasma foram ativadas pela adição de uma solução ácido clorídrico, seguida da neutralização por uma solução de hidróxido de sódio / N-(2-hidroxi-etil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico) (NaOH/HEPES), de acordo com as instruções do fabricante. Após a etapa de ativação, as amostras de plasma foram diluídas 1:2.

##### **4.4.1.2.2 Realização do ensaio**

O princípio do teste é o mesmo descrito para sEng, diferindo-se somente em relação ao anticorpo imobilizado na microplaca (anticorpo monoclonal anti-TGF- $\beta$ 1)

e à composição do anticorpo do conjugado anticorpo-enzima (anticorpo monoclonal anti-TGF- $\beta$ 1).

A concentração de TGF- $\beta$ 1 de cada amostra foi obtida interpolando-se a absorbância lida em uma curva de calibração, conforme orientação do fabricante.

#### **4.4.1.3 ELISA para a determinação dos receptores solúveis do TNF- $\alpha$**

A determinação das concentrações plasmáticas de sTNF-R1 e de sTNF-R2 foi realizada pelo método de imunoenensaio quantitativo enzimático do tipo sanduíche, de acordo com as instruções do fabricante (DuoSet, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN).

##### **4.4.1.3.1 Sensibilização e bloqueio da microplaca**

Microplacas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 $\mu$ L/poço de anticorpo monoclonal de captura previamente diluído. A diluição do anticorpo de captura foi realizada adicionando-se 55,5 $\mu$ L de anticorpo a 10,5mL de solução de tampão fosfato salino (PBS) 1x. A solução de PBS 1x contém cloreto de sódio (NaCl) 137mM, cloreto de potássio (KCl) 2,7mM, fosfato de sódio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 8,1mM e fosfato monobásico de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1,5mM em água destilada.

Após incubação a 4°C *overnight*, os anticorpos não ligados foram removidos por meio de 4 lavagens sucessivas. As lavagens foram realizadas utilizando-se, em cada poço da placa, 300 $\mu$ L de solução de PBS 1x contendo 0,1% de *Tween* 20 (PBS/*Tween*).

Em seguida à lavagem, foi feito o bloqueio adicionando a cada poço da microplaca 200 $\mu$ L de solução de bloqueio contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA) diluída em PBS 1x (PBS/BSA 1%) e, posteriormente, incubação por 2 horas à temperatura ambiente. Após a incubação, a solução de bloqueio foi desprezada e a microplaca foi submetida a 4 lavagens com PBS/*Tween*.



#### 4.4.1.3.2 Realização do ensaio

As amostras de plasma foram diluídas 10 vezes com solução de PBS 1x contendo 0,1% de BSA (PBS/BSA 0,1%) antes de iniciar o ensaio. Os padrões foram reconstituídos conforme instruções do fabricante, obtendo-se materiais com concentrações iguais a 30ng/mL (sTNF-R1) e 80ng/mL (sTNF-R2). Após a reconstituição, foram realizadas diluições seriadas 1:2 dos padrões para que fossem obtidos sete pontos de calibração, com concentrações de nível mais alto de 800pg/mL (sTNF-R1) e 1000pg/mL (sTNF-R2). Os padrões diluídos foram determinados em duplicata.

Em seguida, 100µL das amostras-teste ou dos padrões diluídos foram adicionados a cada um dos poços da microplaca, que ficou incubada a 4°C *overnight*. Seguindo-se à incubação, foram realizadas lavagens sucessivas com o objetivo de retirar os antígenos que não se ligaram ao anticorpo adsorvido na microplaca. Cada um dos poços da microplaca foi lavado 4 vezes com 300 µL de PBS/*Tween*. A etapa subsequente do ensaio consistiu na adição de 100µL de anticorpo de detecção biotilado diluído a cada um dos poços de reação e incubação à temperatura ambiente por 2 horas. O anticorpo de detecção foi preparado pela diluição de 55,5µL de anticorpo a 10,5mL de solução PBS/BSA 0,1%. Após a incubação, foram realizadas 4 lavagens com PBS/*Tween* com o objetivo de retirar os anticorpos de detecção que não se ligaram ao complexo antígeno-anticorpo de captura adsorvido à microplaca. Para a revelação da reação foram adicionados a cada poço da microplaca 100µL do conjugado estreptavidina-*horseradish* peroxidase (HRP) diluído, seguida da incubação à temperatura ambiente por 30 minutos. O conjugado estreptavidina-HRP foi preparado diluindo-se 50µL em 10,5mL de solução PBS/BSA 0,1%. Em seguida, 100µL do substrato ortofenilenodiamina (OPD) foi adicionado a cada poço da microplaca, que foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos e ao abrigo da luz. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50µL de ácido sulfúrico 1M. A intensidade da cor produzida foi medida espectrofotometricamente em 490nm e era proporcional à concentração de sTNF-R1 ou sTNF-R2 no plasma.

A concentração de sTNF-R1 ou sTNF-R2 de cada amostra foi obtida interpolando-se a absorbância lida em uma curva de calibração, conforme orientação do fabricante.

#### 4.5 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o programa SPSS (versão 13.0).

A normalidade dos dados foi testada pelo método de *Shapiro-Wilk*.

A comparação das variáveis contínuas que apresentaram distribuição normal foi feita pelo Teste *T* de *Student* (dois grupos) ou teste ANOVA seguida pelo teste *post-hoc Least square difference* (LSD) (três grupos). Os dados paramétricos foram apresentados como média (desvio padrão).

A comparação das variáveis contínuas que não apresentaram distribuição normal foi feita pelo teste de *Kruskal-Wallis*. Quando foi detectada diferença entre os grupos, esses foram comparados dois a dois pelo método de *Mann-Whitney*, seguido pela correção de *Bonferroni*. Os dados não paramétricos foram apresentados como mediana (intervalo interquartil 25-75%).

A comparação das variáveis categóricas foi feita pelo teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) de *Pearson* exato ou assintótico. As variáveis categóricas foram apresentadas como número absoluto (porcentagem).

O coeficiente de *Spearman* (*r*) foi utilizado para avaliar a existência de correlação entre as variáveis contínuas estudadas: características clínicas, parâmetros laboratoriais e níveis plasmáticos de sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1 e sTNF-R2.

Para a análise multivariada de regressão logística, foram consideradas como variáveis independentes os seguintes parâmetros: ganho de peso na gestação, número de primigestas e níveis plasmáticos de sEng, sTNF-R1 e sTNF-R2. Foram elaborados três modelos, considerando como variáveis dependentes: gestantes com PE X gestantes normotensas, PE precoce X PE tardia e PE grave x PE leve.

Primeiramente foi realizada uma análise univariada com cada variável independente, em cada modelo. Aqueles parâmetros cuja associação com a variável dependente apresentou significância  $\leq 0,20$  foram incluídos na análise multivariada. O modelo final foi fixado quando todas as variáveis atingiram um valor de significância  $\leq 0,05$  e uma adequação medida pelo Teste de *Hosmer and Lemeshow*.

Um valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo em todos os testes.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Características clínicas dos grupos avaliados

Os dados das participantes dos três grupos foram obtidos durante a entrevista para preenchimento da ficha clínica. As características clínicas das participantes dos grupos II (gestantes normotensas) e III (gestantes com PE) também foram obtidas nos prontuários médicos e no cartão de pré-natal.

As características clínicas das participantes dos três grupos avaliados neste estudo estão apresentadas na **TABELA 1**.

**TABELA 1**  
**Características clínicas das participantes do estudo**

	<b>Grupo I (n=23)</b>	<b>Grupo II (n=21)</b>	<b>Grupo III (n=43)</b>	<b>p<sup>1</sup></b>	<b>p<sup>2</sup></b>	<b>p<sup>3</sup></b>	<b>p<sup>4</sup></b>
<b>Idade (anos)<sup>A</sup></b> <b>DP/IQ (25-75%)</b> <b>(n)</b>	24 (23-29) (23)	24 (19-27) (21)	26 (22-30) (43)	-	-	-	0,448
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)<sup>B</sup></b> <b>DP/IQ (25-75%)</b> <b>(n)</b>	21,6 (2,8) (23)	22,5 (3,7) (21)	23,4 (2,9) (42)	-	-	-	0,345
<b>GPG (Kg)<sup>A</sup></b> <b>DP/IQ (25-75%)</b> <b>(n)</b>	n.a.	10,2 (7,8-12,6) (20)	13,5 (9,4-22,1) (42)	-	-	0,024*	-
<b>IG (sem.)<sup>A</sup></b> <b>DP/IQ (25-75%)</b> <b>(n)</b>	n.a.	35 (31-39) (21)	34 (32-37) (43)	-	-	0,667	-
<b>Primigestas<sup>C</sup></b> <b>(%)</b> <b>(n)</b>	n.a.	5 (24) (21)	24 (56) (43)	-	-	0,016*	-
<b>PA sist. (mmHg)<sup>A</sup></b> <b>DP/IQ (25-75%)</b> <b>(n)</b>	110 (110-120) (23)	110 (100-110) (21)	160 (150-172) (43)	0,024*	<0,001**	<0,001**	<0,001**
<b>PA diast. (mmHg)<sup>A</sup></b> <b>DP/IQ (25-75%)</b> <b>(n)</b>	70 (60-80) (23)	70 (70-70) (21)	107 (100-116) (43)	0,445	<0,001**	<0,001**	<0,001**

IMC: Índice de massa corporal (antes da gestação para os grupos II e III); GPG: ganho de peso na gestação; IG: idade gestacional; sem: semanas; PA: pressão arterial; sist.: sistólica; diast.: diastólica; n.a.: não se aplica.

Grupo I: Mulheres não gestantes; Grupo II: Gestantes normotensas; Grupo III: Gestantes com PE.

<sup>A</sup>Os dados não paramétricos são apresentados como mediana (intervalo interquartil 25-75%) (*Kruskal-Wallis/Mann-Whitney/Correção de Bonferroni*). <sup>B</sup>Os dados paramétricos são apresentados como média (desvio padrão) (ANOVA/LSD/Teste *t-Student*). <sup>C</sup>As variáveis categóricas são apresentadas como número absoluto (porcentagem) (Teste  $\chi^2$  de Pearson). \* $p \leq 0,05$ . \*\* $p \leq 0,017$  (Correção de Bonferroni).

p<sup>1</sup>: grupo I x grupo II; p<sup>2</sup>: grupo I x grupo III; p<sup>3</sup>: grupo II x grupo III; p<sup>4</sup>: grupo I x grupo II x grupo III.

A comparação da idade ( $p=0,448$ ) e do índice de massa corporal ( $p=0,345$ ) das integrantes dos três grupos revelou que não houve diferença significativa entre os valores observados.

A idade gestacional não diferiu significativamente comparando-se os grupos II e III ( $p=0,667$ ). Entretanto, o ganho de peso na gestação ( $p=0,024$ ) e o número de primigestas ( $p=0,016$ ) foram significativamente superiores no grupo III quando comparados ao grupo II.

Os valores da pressão arterial sistólica e diastólica foram diferentes comparando-se os três grupos avaliados, sendo maior no grupo III em relação aos demais grupos (todos os valores de  $p<0,001$ ). Não foi observada diferença estatisticamente significativa ao comparar os valores da pressão arterial diastólica ( $p=0,445$ ) entre os grupos I e II. A pressão arterial sistólica foi maior no grupo I em relação ao grupo II ( $p=0,024$ ), no entanto a significância estatística não foi alcançada após a correção de *Bonferroni* e as medianas dos valores estavam dentro da normalidade.

As 43 pacientes pré-eclâmpticas foram distribuídas em dois subgrupos de acordo com a idade gestacional na qual surgiram os sintomas, sendo 19 (44%) com a forma precoce e 24 (56%) com a forma tardia (**TABELA 2**).

**TABELA 2**  
**Características clínicas das gestantes com PE precoce (n=19) e PE tardia (n=24)**

	PE precoce	PE tardia	p
Idade (anos) <sup>A</sup>	27	27	
DP/IQ (25-75%)	(7)	(5)	0,632
(n)	(19)	(24)	
IMC antes da gestação (Kg/m <sup>2</sup> ) <sup>A</sup>	23,6	23,3	
DP/IQ (25-75%)	(2,7)	(3,1)	0,956
(n)	(19)	(23)	
GPG (Kg) <sup>B</sup>	12,0	16,4	
DP/IQ (25-75%)	(7,0-16,5)	(11,6-16,4)	0,061
(n)	(19)	(23)	
IG (sem.) <sup>B</sup>	31	37	
DP/IQ (25-75%)	(30-32)	(35-38)	<0,001*
(n)	(19)	(24)	
Primigestas <sup>C</sup>	11	13	
(%)	(58)	(54)	0,807
(n)	(19)	(24)	
PA sist. (mmHg) <sup>B</sup>	170	160	
DP/IQ (25-75%)	(160-180)	(140-170)	0,027*
(n)	(19)	(24)	
PA diast. (mmHg) <sup>B</sup>	110	100	
DP/IQ (25-75%)	(100-120)	(100-110)	0,205
(n)	(19)	(24)	

IMC: Índice de massa corporal; GPG: ganho de peso na gestação; IG: idade gestacional; sem: semanas; PA: pressão arterial; sist.: sistólica; diast.: diastólica.

<sup>A</sup>Os dados paramétricos são apresentados como média (desvio padrão) (Teste *t-Student*). <sup>B</sup>Os dados não paramétricos são apresentados como mediana (intervalo interquartil 25-75%) (*Mann-Whitney*).

<sup>C</sup>As variáveis categóricas são apresentadas como número absoluto (porcentagem) (Teste  $\chi^2$  de Pearson). \* $p\leq 0,05$ .

As gestantes com PE foram, ainda, distribuída em outros dois subgrupos, com relação à gravidade da doença, sendo 12 (28%) com a forma leve e 31 (72%) com a forma grave da doença (**TABELA 3**).

**TABELA 3**  
**Características clínicas das gestantes com PE leve (n=12) e PE grave (n=31)**

	PE leve	PE grave	p
Idade (anos) <sup>A</sup>	25	26	
DP/IQ (25-75%)	(21-29)	(21-32)	0,621
(n)	(12)	(31)	
IMC antes da gestação (Kg/m <sup>2</sup> ) <sup>B</sup>	23,7	23,0	
DP/IQ (25-75%)	(2,7)	(3,0)	0,470
(n)	(12)	(30)	
GPG (Kg) <sup>A</sup>	16,0	12,8	
DP/IQ (25-75%)	(9,6-21,3)	(8,6-22,5)	0,071
(n)	(12)	(30)	
IG (sem.) <sup>A</sup>	37	33	
DP/IQ (25-75%)	(34-38)	(31-36)	0,104
(n)	(12)	(31)	
Primigestas <sup>C</sup>	7	17	
(%)	(58)	(55)	0,053
(n)	(12)	(31)	
PA sist. (mmHg) <sup>A</sup>	143	170	
DP/IQ (25-75%)	(140-150)	(160-180)	<0,001*
(n)	(12)	(31)	
PA diast. (mmHg) <sup>A</sup>	100	110	
DP/IQ (25-75%)	(96-100)	(100-120)	<0,001*
(n)	(12)	(31)	

IMC: Índice de massa corporal; GPG: ganho de peso na gestação; IG: idade gestacional; sem: semanas; PA: pressão arterial; sist.: sistólica; diast.: diastólica.

<sup>A</sup>Os dados não paramétricos são apresentados como mediana (intervalo interquartil 25-75%) (*Mann-Whitney*). <sup>B</sup>Os dados paramétricos são apresentados como média (desvio padrão) (*Teste t-Student*).

<sup>C</sup>As variáveis categóricas são apresentadas como número absoluto (porcentagem) (*Teste  $\chi^2$  de Pearson*). \*p≤0,05.

Dentre as gestantes com PE precoce, 17 (90%) apresentavam a forma grave da doença, em contraste com 14 (58%) daquelas com PE tardia.

Não foram observadas diferenças significativas em relação à idade (p=0,632), ao índice de massa corporal antes da gestação (p=0,956), ao ganho de peso durante a gestação (p=0,061) e ao número de primigestas (p=0,807) entre as gestantes com PE precoce e tardia.

Conforme esperado, as gestantes com PE precoce apresentaram idade gestacional inferior no momento da coleta de sangue em comparação às gestantes com PE tardia (p<0,001).

A pressão arterial sistólica foi significativamente superior no grupo de gestantes com PE precoce quando comparado às gestantes com PE tardia

( $p=0,027$ ), enquanto a pressão arterial diastólica não diferiu entre esses dois subgrupos ( $p=0,205$ ).

A idade ( $p=0,621$ ), o índice de massa corporal antes da gestação ( $p=0,470$ ), o ganho de peso na gestação ( $p=0,071$ ) e a idade gestacional (0,104) não diferiram significativamente ao se comparar os subgrupos de gestantes com PE leve e grave. Por outro lado, os valores de pressão arterial sistólica ( $p<0,001$ ) e diastólica ( $p<0,001$ ) foram superiores nas gestantes com a forma grave da doença, como esperado. As gestantes com PE leve também apresentaram maior número de primigestas em comparação às gestantes com a forma grave da doença ( $p=0,053$ ), embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa.

Com relação à sintomatologia clínica, 30 gestantes (70%) com PE relataram sintomas, incluindo cefaleia em 29 gestantes (97%), escotoma em 10 (33%), epigastralgia em 5 (17%) e reflexo patelar aumentado em 1 (3%). A presença de edema foi observada, em graus variados, em 22 gestantes (51%) com PE.

A gravidez gemelar foi observada em 3 gestantes (7%) com PE, enquanto no grupo de gestantes normotensas não houve nenhum caso.

Duas pacientes com PE grave tardia evoluíram para síndrome HELLP e nenhuma evoluiu para eclâmpsia.

A terapia anti-hipertensiva utilizada em 32 gestantes (74%) com PE incluiu nifedipina em 25 gestantes (78%), metildopa em 15 gestantes (47%) e hidralazina em 3 gestantes (9%). Dentre as gestantes que fizeram uso de terapia anti-hipertensiva, 12 (38%) utilizaram mais de um anti-hipertensivo simultaneamente. Para a prevenção das crises convulsivas foi administrado sulfato de magnésio em 14 gestantes (33%) e para induzir a maturação pulmonar do feto, visando à interrupção da gestação, foi administrado betametasona ou dexametasona a 17 gestantes (40%). Em 13 (30%) gestantes com PE foi administrado paracetamol ou dipirona como analgésico, 7 (16%) misoprostol para induzir o parto e 6 (14%) hioscina como antiespasmódico.

Onze (52%) gestantes normotensas relataram o uso de um ou mais medicamentos. Dentre essas gestantes, 10 (91%) utilizaram sulfato ferroso ou ácido fólico, 2 (18%) dipirona ou paracetamol e 1 (9%) escopolamina.

Onze (48%) mulheres não gestantes relataram o uso de um ou mais medicamentos. Dentre essas mulheres, 11 (100%) utilizaram anticoncepcional oral ou injetável e 1 (9%) timolol, para o tratamento de glaucoma.

## 5.2 Avaliação dos parâmetros laboratoriais das gestantes com PE

Os dados laboratoriais das gestantes com PE, obtidos a partir dos prontuários médicos, estão apresentados na **TABELA 4**.

**TABELA 4**  
Parâmetros laboratoriais das gestantes com PE (grupo III, n=43)

Parâmetros	Média/Mediana	DP/IQ (25-75%)	Intervalo de referência <sup>1</sup>
Número de hemácias x 10 <sup>3</sup> /mL <sup>A</sup>	4.076 (n=38)	638	4.200 a 5.500
Hemoglobina (g/dL) <sup>A</sup>	11,5 (n=42)	2,5	12,0 a 16,0
Hematócrito (%) <sup>A</sup>	35 (n=42)	7	37 a 47
Número de plaquetas x 10 <sup>3</sup> /mL <sup>A</sup>	187 (n=42)	83	150 a 440
Contagem global de leucócitos /mm <sup>3A</sup>	10.077 (n=26)	3.479	4.300 a 10.000
AST (U/L) <sup>A</sup>	27 (n=42)	14	<31
ALT (U/L) <sup>B</sup>	19 (n=42)	9-27	<34
Ácido úrico (mg/dL) <sup>A</sup>	5,9 (n=37)	1,3	2,6 a 6,0
LDH (U/L) <sup>B</sup>	406 (n=35)	336-522	200 a 480
Ureia (mg/dL) <sup>A</sup>	22 (n=32)	6	15 a 40
Creatinina (mg/dL) <sup>A</sup>	0,8 (n=35)	0,2	0,6 a 1,1
Proteinúria (g/24hs) <sup>A</sup>	3,25 (n=18)	2,48	<0,15
Proteinúria fita <sup>C</sup>	n=35	-	Negativa
Negativa	02 (5,7%)	-	
Positiva			
1+	01 (2,9%)	-	
2+	01 (2,9%)	-	
3+	16 (45,7%)	-	
4+	15 (42,8%)	-	

AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotranferase; LDH: lactato desidrogenase.

<sup>A</sup>Os dados paramétricos são apresentados como média, desvio padrão (DP). <sup>B</sup>Os dados não paramétricos são apresentados como mediana, intervalo interquartil (IQ) 25-75%. <sup>C</sup>As variáveis categóricas são apresentadas como número absoluto (porcentagem).

<sup>1</sup>BURTIS; ASHWOOD; BRUNS, 2008; WINTROBE, 1981. Esse intervalo de referência leva em consideração uma população de indivíduos saudáveis e não somente gestantes saudáveis.

A análise da **TABELA 4** mostra que as médias da contagem de hemácias, dos níveis de hemoglobina e do hematócrito estavam abaixo da faixa de referência, enquanto as médias da contagem global de leucócitos e a proteinúria estavam acima. Embora a média e mediana dos demais parâmetros laboratoriais estivessem dentro da faixa de referência, 14 gestantes (40%) com PE apresentaram níveis aumentados de LDH, 13 (35%) de ácido úrico, 10 (24%) de AST, 3 (14%) de ureia, 3 (7%) de ALT e 2 (6%) de creatinina. Oito gestantes (19%) com PE apresentaram plaquetopenia.

Os parâmetros laboratoriais dos subgrupos de gestantes, de acordo com a idade gestacional na qual surgiram os sintomas estão apresentados na **TABELA 5**.

**TABELA 5**  
**Parâmetros laboratoriais das gestantes com PE precoce (n=19) e PE tardia (n=24)**

Parâmetros	PE precoce	PE tardia	p
Número de hemácias x 10 <sup>3</sup> /mL <sup>A</sup>	4.290	3.920	0,601
DP/IQ (25-75%)	(3.740-4.480)	(3.695-4.495)	
(n)	(17)	(21)	
Hemoglobina (g/dL) <sup>B</sup>	11,3	11,6	0,809
DP/IQ (25-75%)	(3,1)	(2,2)	
(n)	(19)	(23)	
Hematócrito (%) <sup>B</sup>	34	35	0,914
DP/IQ (25-75%)	(8)	(6)	
(n)	(19)	(23)	
Número de plaquetas x 10 <sup>3</sup> /mL <sup>B</sup>	243	156	0,221
DP/IQ (25-75%)	(73)	(74)	
(n)	(19)	(23)	
Contagem global de leucócitos /mm <sup>3</sup> <sup>B</sup>	10.520	9.831	0,358
DP/IQ (25-75%)	(4.061)	(3.352)	
(n)	(10)	(16)	
AST (U/L) <sup>B</sup>	25	29	0,785
DP/IQ (25-75%)	(9)	(17)	
(n)	(19)	(23)	
ALT (U/L) <sup>B</sup>	19	21	0,589
DP/IQ (25-75%)	(7)	(18)	
(n)	(19)	(23)	
Ácido úrico (mg/dL) <sup>B</sup>	5,6	6,1	0,532
DP/IQ (25-75%)	(1,2)	(1,4)	
(n)	(17)	(20)	
LDH (U/L) <sup>B</sup>	359	538	0,344
DP/IQ (25-75%)	(86)	(374)	
(n)	(17)	(18)	
Ureia (mg/dL) <sup>B</sup>	23	21	0,073
DP/IQ (25-75%)	(3)	(7)	
(n)	(14)	(18)	
Creatinina (mg/dL) <sup>A</sup>	0,8	0,7	0,257
DP/IQ (25-75%)	(0,6-1,0)	(0,6-0,8)	
(n)	(16)	(19)	
Proteinúria fita <sup>C</sup>	n=14	n=21	0,551
Negativa	1 (7,1%)	1 (4,8%)	
Positiva			
1+	0 (0,0%)	1 (4,8%)	
2+	0 (0,0%)	1 (4,8%)	
3+	5 (35,8%)	11 (52,4%)	
4+	8 (57,1%)	7 (33,2%)	

AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotranferase; LDH: lactato desidrogenase.

<sup>A</sup>Os dados não paramétricos são apresentados como mediana (intervalo interquartil 25-75%) (*Mann-Whitney*). <sup>B</sup>Os dados paramétricos são apresentados como média (desvio padrão) (*Teste t-Student*).

<sup>C</sup>As variáveis categóricas são apresentadas como número absoluto (porcentagem) (*Teste  $\chi^2$  de Pearson*). \*p≤0,05.

Para todos os parâmetros laboratoriais foram obtidos valores similares nos subgrupos PE precoce e PE tardia.

Os parâmetros laboratoriais dos subgrupos do grupo de gestantes, de acordo com a gravidade da doença estão apresentados na **TABELA 6**.



**TABELA 6**  
**Parâmetros laboratoriais das gestantes com PE leve (n=12) e PE grave (n=31)**

Parâmetros	PE leve	PE grave	p
Número de hemácias x 10 <sup>3</sup> /mL <sup>A</sup> DP/IQ (25-75%) (n)	4.522 (510) (8)	3.828 (581) (30)	0,238
Hemoglobina (g/dL) <sup>B</sup> DP/IQ (25-75%) (n)	12,8 (2,1) (11)	10,8 (2,4) (31)	0,075
Hematócrito (%) <sup>B</sup> DP/IQ (25-75%) (n)	37 (6) (11)	33 (7) (31)	0,281
Número de plaquetas x 10 <sup>3</sup> /mL <sup>B</sup> DP/IQ (25-75%) (n)	233 (71) (11)	162 (81) (31)	0,858
Contagem global de leucócitos /mm <sup>3</sup> <sup>B</sup> DP/IQ (25-75%) (n)	9.836 (4.014) (8)	10.211 (3.340) (18)	0,793
AST (U/L) <sup>B</sup> DP/IQ (25-75%) (n)	21 (6) (12)	31 (17) (30)	0,120
ALT (U/L) <sup>B</sup> DP/IQ (25-75%) (n)	14 (9-25) (12)	19 (8-21) (30)	0,040*
Ácido úrico (mg/dL) <sup>B</sup> DP/IQ (25-75%) (n)	5,8 (1,7) (11)	6,0 (1,2) (26)	0,702
LDH (U/L) <sup>B</sup> DP/IQ (25-75%) (n)	407 (255-476) (12)	353 (326-664) (23)	0,903
Ureia (mg/dL) <sup>B</sup> DP/IQ (25-75%) (n)	21 (4) (11)	23 (6) (21)	0,273
Creatinina (mg/dL) <sup>A</sup> DP/IQ (25-75%) (n)	0,6 (0,1) (11)	0,9 (0,2) (24)	0,100
Proteinúria fita <sup>C</sup>	n=11	n=24	0,173
Negativa	1 (9,1%)	1 (4,2%)	
Positiva		0 (0,0%)	
1+	1 (9,1%)		
2+	0 (0,0%)	1 (4,2%)	
3+	7 (63,6%)	9 (37,5%)	
4+	2 (18,2%)	13 (54,1%)	

AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotranferase; LDH: lactato desidrogenase.

<sup>A</sup>Os dados paramétricos são apresentados como média (desvio padrão) (Teste *t-Student*). <sup>B</sup>Os dados não paramétricos são apresentados como mediana (intervalo interquartil 25-75%) (*Mann-Whitney*).

<sup>C</sup>As variáveis categóricas são apresentadas como número absoluto (porcentagem) (Teste  $\chi^2$  de Pearson). \*p≤0,05.

A atividade da enzima ALT foi superior no grupo de gestantes com PE grave em relação ao grupo com PE leve (p=0,040), embora estivesse dentro da faixa de referência. Os demais parâmetros laboratoriais não diferiram significativamente entre esses subgrupos.

A análise estatística dos resultados de proteinúria de 24 horas não foi feita, devido ao pequeno tamanho amostral de cada subgrupo.

### 5.3 Avaliação de sEng, TGF- $\beta$ 1 e dos receptores solúveis do TNF- $\alpha$

A **TABELA 7** mostra os resultados de sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1 e sTNF-R2 obtidos para as mulheres não gestantes (grupo I), gestantes normotensas (grupo II) e gestantes com PE (grupo III).

**TABELA 7**  
Níveis plasmáticos de sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1 e sTNF-R2 em mulheres não gestantes, gestantes normotensas e gestantes com PE

	Grupo I (n=21)	Grupo II (n=23)	Grupo III (n=43)	p <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>	p <sup>3</sup>	p <sup>4</sup>
sEng (ng/mL) <sup>A</sup> DP/IQ (25-75%) (n)	4,45 (3,94-5,10) (20)	7,81 (4,78-9,42) (20)	29,34 (16,76- 55,29) (37)	<0,001**	<0,001**	<0,001**	<0,001**
TGF- $\beta$ 1 (pg/mL) <sup>A</sup> DP/IQ (25-75%) (n)	245 (225-268) (20)	243 (220-311) (19)	238 (223-252) (36)	-	-	-	0,328
sTNF-R1 (pg/mL) <sup>A</sup> DP/IQ (25-75%) (n)	1.909 (1.649- 2.182) (20)	3.028 (2.468- 3.606) (20)	3.479 (3.182-4.339) (40)	<0,001**	<0,001**	0,014**	<0,001**
sTNF-R2 (pg/mL) <sup>B</sup> DP/IQ (25-75%) (n)	6.508 (1.241) (20)	8.931 (1.277) (20)	8.698 (1.602) (40)	<0,001**	0,001**	0,151	<0,001**

sEng: endoglina solúvel; TGF- $\beta$ 1: fator de crescimento transformante beta-1; sTNF-R1: receptor solúvel 1 do fator de necrose tumoral alfa; sTNF-R2: receptor solúvel 2 do fator de necrose tumoral alfa.

Grupo I: Mulheres não gestantes; Grupo II: Gestantes normotensas; Grupo III: Gestantes com PE.

<sup>A</sup>Os dados não paramétricos são apresentados como mediana (intervalo interquartil 25-75%) (*Kruskal-Wallis/Mann-Whitney/Correção de Bonferroni*). <sup>B</sup>Os dados paramétricos são apresentados como média (desvio padrão) (ANOVA/LSD/Teste *t-Student*). \*p $\leq$ 0,05. \*\*p $\leq$ 0,017.

p<sup>1</sup>: grupo I x grupo II; p<sup>2</sup>: grupo I x grupo III; p<sup>3</sup>: grupo II x grupo III; p<sup>4</sup>: grupo I x grupo II x grupo III.

As gestantes com PE mostraram níveis aumentados de sEng (p<0,001) e sTNF-R1 (p=0,014) em relação às gestantes normotensas. No entanto, os níveis de sTNF-R2 foram similares entre esses dois grupos (p=0,151). As gestantes normotensas apresentaram níveis mais elevados de sEng (p<0,001), e de ambos os receptores solúveis do TNF- $\alpha$  (todos os valores de p<0,001) comparando às mulheres não gestantes. Os níveis plasmáticos de TGF- $\beta$ 1 não diferiram significativamente entre os três grupos avaliados (p=0,328).

Os níveis plasmáticos de sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1 e sTNF-R2 nos subgrupos PE precoce e PE tardia estão apresentados na **TABELA 8**.

**TABELA 8**  
**Níveis plasmáticos de sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1 e sTNF-R2 em gestantes com PE de acordo com a idade gestacional na qual surgiram os sintomas da doença**

	PE precoce	PE tardia	p
sEng (ng/mL) <sup>A</sup>	44,59	22,19	0,077
DP/IQ (25-75%)	(21,29-60,19)	(13,44-48,19)	
(n)	(14)	(23)	
TGF- $\beta$ 1 (pg/mL) <sup>B</sup>	236	238	0,928
DP/IQ (25-75%)	(16)	(27)	
(n)	(15)	(21)	
sTNF-R1 (pg/mL) <sup>A</sup>	3.295	3.830	0,004*
DP/IQ (25-75%)	(2.949-3.638)	(3.238-4.693)	
(n)	(18)	(22)	
sTNF-R2 (pg/mL) <sup>B</sup>	7.673	9.249	0,003*
DP/IQ (25-75%)	(1.460)	(1.467)	
(n)	(18)	(22)	

sEng: endoglina solúvel; TGF- $\beta$ 1: fator de crescimento transformante beta-1; sTNF-R1: receptor solúvel 1 do fator de necrose tumoral alfa; sTNF-R2: receptor solúvel 2 do fator de necrose tumoral alfa.

<sup>A</sup>Os dados não paramétricos são apresentados como mediana (intervalo interquartil 25-75%) (*Mann-Whitney*). <sup>B</sup>Os dados paramétricos são apresentados como média (desvio padrão) (*Teste t-Student*). \*p $\leq$ 0,05.

As gestantes com PE tardia apresentaram níveis aumentados de ambos os receptores solúveis do TNF- $\alpha$  em relação às gestantes com PE precoce (sTNF-R1: p=0,004; sTNF-R2: p=0,003). Em contraste, o subgrupo PE precoce apresentou maiores concentrações de sEng em comparação ao subgrupo PE tardia, porém as diferenças não foram estatisticamente significativas (p=0,077). Não houve diferenças significativas nos níveis TGF- $\beta$ 1 comparando-se esses dois subgrupos (p=0,928).

Os níveis plasmáticos de sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1 e sTNF-R2 em gestantes com PE de acordo com a gravidade da doença estão apresentados na **TABELA 9**.

**TABELA 9**  
**Níveis plasmáticos de sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1 e sTNF-R2 em gestantes com PE de acordo com a gravidade da doença**

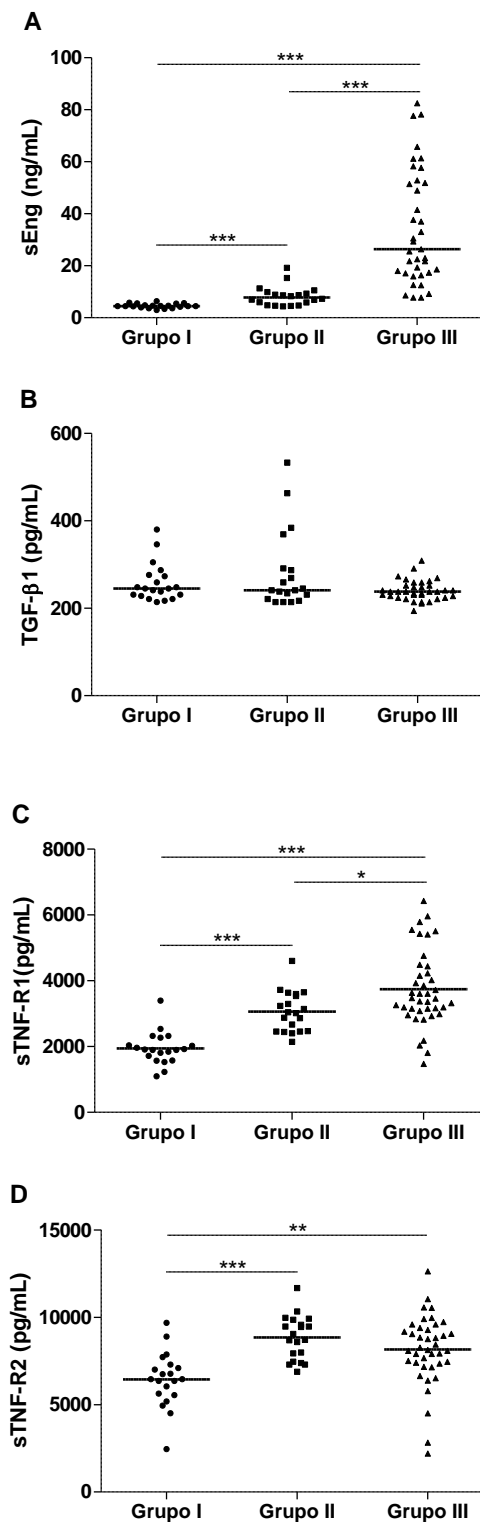
	PE leve	PE grave	p
sEng (ng/mL) <sup>A</sup> DP/IQ (25-75%) (n)	17,26 (11,74-24,53) (12)	44,59 (19,01-60,49) (25)	0,005*
TGF- $\beta$ 1 (pg/mL) <sup>B</sup> DP/IQ (25-75%) (n)	250 (37) (10)	237 (14) (26)	0,110
sTNF-R1 (pg/mL) <sup>A</sup> DP/IQ (25-75%) (n)	3.281 (3.147-4.229) (12)	3.609 (3.280-5.182) (28)	0,723
sTNF-R2 (pg/mL) <sup>B</sup> DP/IQ (25-75%) (n)	8.551 (864) (12)	7.987 (2.314) (28)	0,421

sEng: endoglinina solúvel; TGF- $\beta$ 1: fator de crescimento transformante-beta 1; sTNF-R1: receptor solúvel 1 do fator de necrose tumoral alfa; sTNF-R2: receptor solúvel 2 do fator de necrose tumoral alfa.

<sup>A</sup>Os dados não paramétricos são apresentados como mediana (intervalo interquartil 25-75%) (*Mann-Whitney*). <sup>B</sup>Os dados paramétricos são apresentados como média (desvio padrão) (*Teste t-Student*). \*p $\leq$ 0,05.

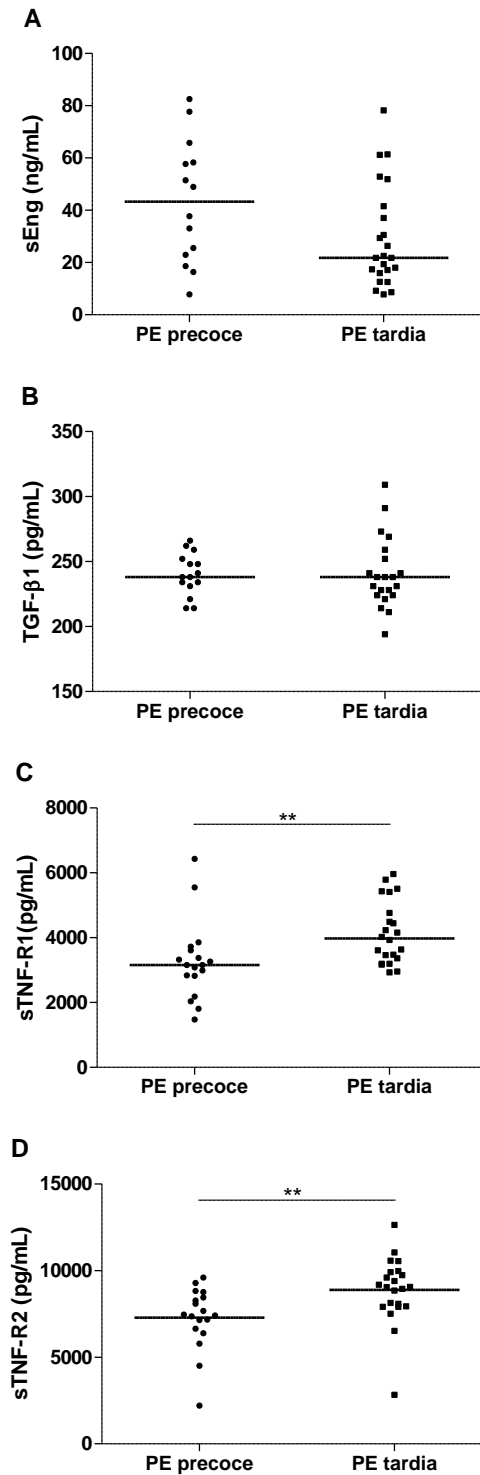
Somente os níveis plasmáticos de sEng foram significativamente aumentados nas gestantes com PE grave quando comparadas às gestantes com a forma leve da doença (p=0,005).

A **FIGURA 6** ilustra os níveis plasmáticos sEng **(A)**, TGF- $\beta$ 1 **(B)**, sTNF-R1 **(C)** e sTNF-R2 **(D)** nos três grupos de mulheres avaliados.



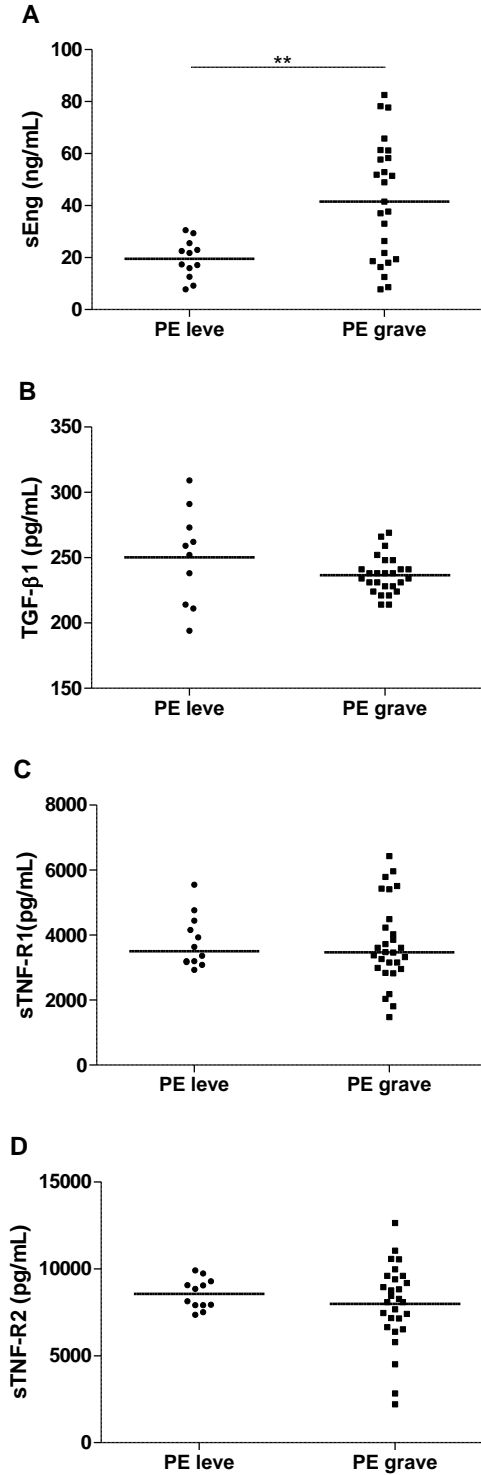
**FIGURA 6 – Níveis plasmáticos de sEng (A), TGF-β1 (B), sTNF-R1 (C) e sTNF-R2 (D) em mulheres não gestantes (grupo I), gestantes normotensas (grupo II) e gestantes com PE (grupo III). As barras horizontais representam a mediana dos níveis de sEng, TGF-β1, sTNF-R1 e a média dos níveis de sTNF-R2. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .**

A **FIGURA 7** mostra os níveis de sEng (**A**), TGF- $\beta$ 1 (**B**), sTNF-R1 (**C**) e sTNF-R2 (**D**) em gestantes com PE precoce e tardia.



**FIGURA 7** – Níveis plasmáticos de sEng (**A**), TGF- $\beta$ 1 (**B**), sTNF-R1 (**C**) e sTNF-R2 (**D**) em gestantes com PE precoce e tardia. As barras horizontais representam a mediana dos níveis de sEng e sTNF-R1 e a média dos níveis de TGF- $\beta$ 1 e sTNF-R2. \*\*  $p < 0,01$ .

A **FIGURA 8** mostra os níveis plasmáticos de sEng (**A**), TGF- $\beta$ 1 (**B**), sTNF-R1 (**C**) e sTNF-R2 (**D**) em gestantes com PE leve e grave.



**FIGURA 8** – Níveis plasmáticos de sEng (A), TGF- $\beta$ 1 (B), sTNF-R1 (C) e sTNF-R2 (D) em gestantes com PE leve e grave. As barras horizontais representam a mediana dos níveis de sEng e sTNF-R1 e a média dos níveis de TGF- $\beta$ 1 e sTNF-R2. \*\* $p < 0,01$ .

#### 5.4 Correlações entre sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1 e sTNF-R2 em gestantes normotensas e em gestantes com PE

Foram feitas análises de correlação a fim de estabelecer a associação entre os fatores plasmáticos dosados neste estudo. Os níveis plasmáticos de sTNF-R1 e de sTNF-R2 correlacionaram-se positivamente tanto em gestantes normotensas (grupo II) ( $r=0,461$ ,  $p=0,041$ ), quanto em gestantes com PE (grupo III) ( $r=0,497$ ,  $p=0,001$ ) (TABELA 10). Nenhuma outra correlação estatisticamente significativa foi detectada nesses grupos de gestantes, separadamente.

**TABELA 10**  
Correlações entre os níveis plasmáticos de sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1 e sTNF-R2 em gestantes normotensas e com PE

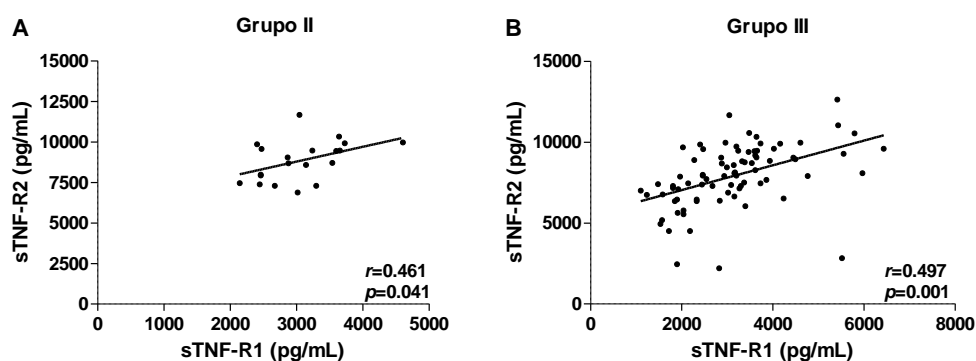
	Grupo II		Grupo III	
	r	p	r	p
sEng vs. TGF- $\beta$ 1	-0,259	0,300	-0,060	0,755
sEng vs. sTNF-R1	0,272	0,260	0,012	0,945
sEng vs. sTNF-R2	0,056	0,819	-0,070	0,694
sTNF-R1 vs. TGF- $\beta$ 1	-0,257	0,288	-0,045	0,794
sTNF-R2 vs. TGF- $\beta$ 1	0,147	0,550	-0,163	0,342
sTNF-R1 vs. sTNF-R2	0,461	0,041*	0,497	0,001*

sEng: endoglina solúvel; TGF- $\beta$ 1: fator de crescimento transformante beta-1; sTNF-R1: receptor solúvel 1 do fator de necrose tumoral alfa; sTNF-R2: receptor solúvel 2 do fator de necrose tumoral alfa.

Grupo II: Gestantes normotensas; grupo III: Gestantes com PE.

vs.: *versus*; r: coeficiente de correlação de Spearman. \* $p \leq 0,05$

A FIGURA 9 ilustra as correlações entre os níveis plasmáticos de sTNF-R1 e sTNF-R2 em gestantes normotensas (grupo II) (A) e com PE (grupo III) (B).



**FIGURA 9 – Correlações entre os níveis de sTNF-R1 e sTNF-R2 em gestantes normotensas (grupo II) (A) e com PE (grupo III) (B).**



### 5.5 Correlações entre sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1, sTNF-R2 e as características clínicas das gestantes normotensas e com PE

Na **TABELA 11** estão representadas as correlações entre os níveis plasmáticos de sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1, sTNF-R2 e as características clínicas das gestantes normotensas (grupo II) e com PE (grupo III). Os valores de IMC antes da gestação não foram considerados nessas análises, pois a obesidade foi um critério de exclusão adotado neste estudo.

**TABELA 11**  
Correlações entre os níveis plasmáticos de sEng, sTNF-R1 e sTNF-R2 e as características clínicas das gestantes normotensas e com PE

	Grupo II		Grupo III	
	r	p	r	p
<b>sEng</b>				
vs. idade	0,271	0,247	0,067	0,694
vs. GPG	0,345	0,148	-0,204	0,232
vs. IG	0,627	0,003*	-0,373	0,023*
vs. PA sist.	0,156	0,512	0,374	0,022*
vs. PA diast.	0,048	0,842	0,188	0,265
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>				
vs. idade	0,171	0,485	0,074	0,667
vs. GPG	-0,089	0,725	-0,293	0,087
vs. IG	-0,124	0,613	-0,029	0,866
vs. PA sist.	0,079	0,749	-0,197	0,250
vs. PA diast.	0,058	0,813	-0,209	0,221
<b>sTNF-R1</b>				
vs. idade	-0,357	0,123	0,024	0,882
vs. GPG	0,193	0,430	0,279	0,086
vs. IG	0,399	0,081	0,451	0,004*
vs. PA sist.	0,401	0,079	-0,111	0,494
vs. PA diast.	0,139	0,560	0,027	0,870
<b>sTNF-R2</b>				
vs. idade	-0,345	0,136	0,307	0,054
vs. GPG	0,208	0,392	0,452	0,004*
vs. IG	0,315	0,177	0,594	<0,001*
vs. PA sist.	0,336	0,148	0,027	0,870
vs. PA diast.	0,058	0,809	0,006	0,968

sEng: endogлина solúvel; GPG: ganho de peso na gestação; IG: idade gestacional; PA: pressão arterial; sist.: sistólica; diast.: diastólica; TGF- $\beta$ 1: fator de crescimento transformante beta-1; sTNF-R1: receptor solúvel 1 do fator de necrose tumoral alfa; sTNF-R2: receptor solúvel 2 do fator de necrose tumoral alfa.

Grupo II: Gestantes normotensas; grupo III: Gestantes com PE.

vs.: *versus*; r: coeficiente de correlação de Spearman. \*p $\leq$ 0,05.

A concentração de sEng na PE correlacionou-se de forma negativa com a idade gestacional (r=-0,373, p=0,023), enquanto uma relação inversa foi observada

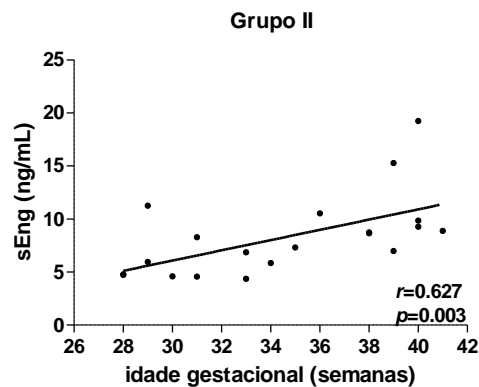
na gestação normotensa ( $r=0,627$ ,  $p=0,003$ ). As concentrações plasmáticas de sTNF-R1 ( $r=0,451$ ,  $p=0,004$ ) e sTNF-R2 ( $r=0,594$ ,  $p<0,001$ ) elevaram-se em função da idade gestacional, porém somente nas gestantes com PE.

Os níveis de sEng apresentaram uma correlação positiva com a pressão arterial sistólica em gestantes com PE ( $r=0,374$ ,  $p=0,022$ ).

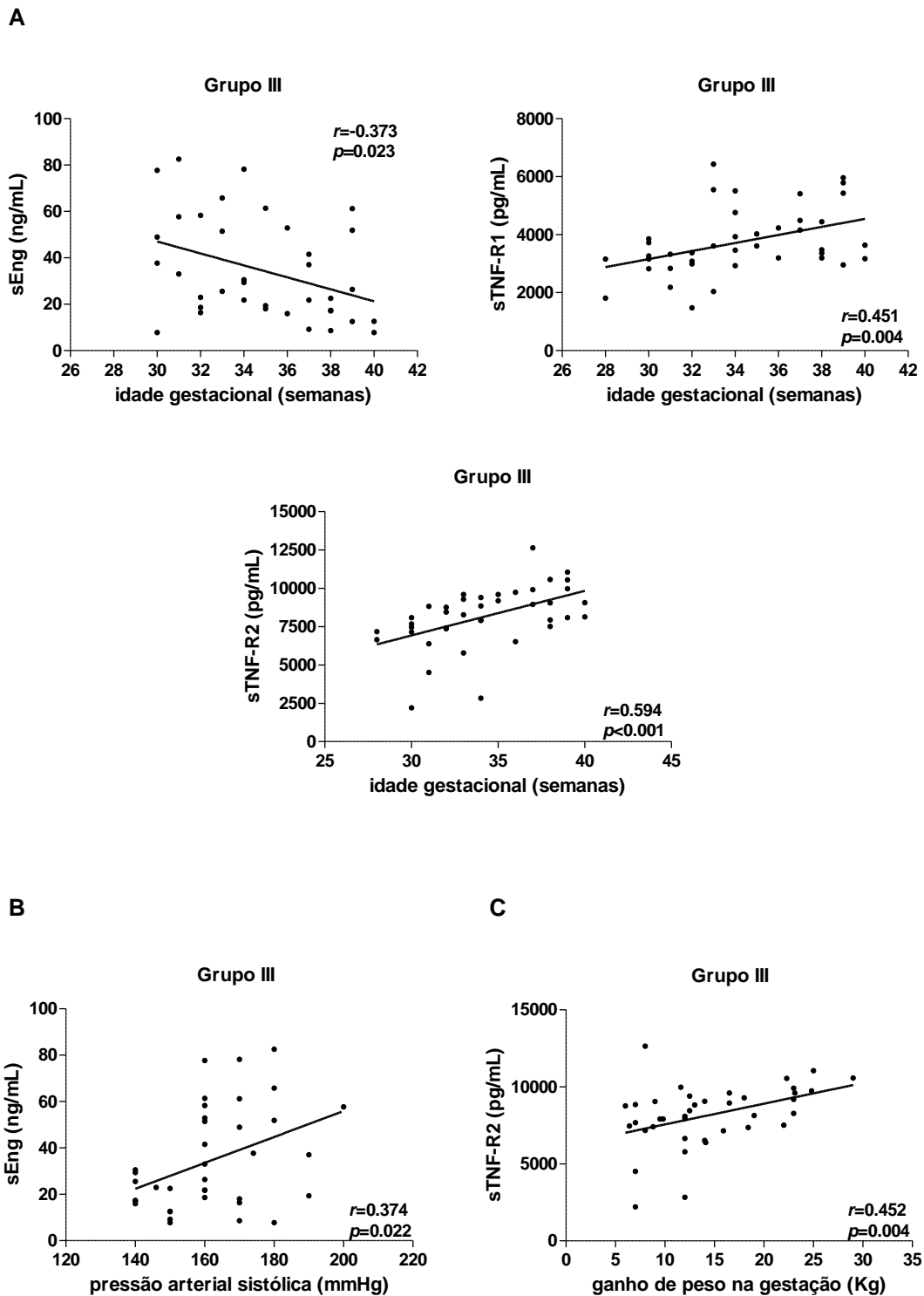
Houve uma correlação positiva entre os níveis de sTNF-R2 e o ganho de peso na gestação com PE ( $r=0,452$ ,  $p=0,004$ ). Também foi observada uma correlação positiva entre os níveis de sTNF-R2 e a idade das gestantes com PE ( $r=0,307$ ,  $p=0,054$ ), porém esse resultado não foi estatisticamente significativo.

Nenhuma correlação estatisticamente significativa foi detectada entre os níveis de TGF- $\beta$ 1 e quaisquer características clínicas analisadas nesses grupos de gestantes.

As correlações estatisticamente significativas que foram encontradas entre os níveis plasmáticos de sEng, sTNF-R1, sTNF-R2 e as características clínicas das gestantes normotensas (grupo II) e com PE (grupo III) estão ilustradas nas **FIGURAS 10 e 11**, respectivamente.



**FIGURA 10 – Correlação entre os níveis de sEng e a idade gestacional em gestantes normotensas (grupo II).**



**FIGURA 11 – Correlações estatisticamente significativas entre os níveis de sEng, sTNF-R1 e sTNF-R2 e as características clínicas das gestantes com PE (grupo III). (A) Correlações entre os níveis de sEng, sTNF-R1 e sTNF-R2 e a idade gestacional. (B) Correlação entre os níveis de sEng e pressão arterial sistólica. (C) Correlação entre os níveis de sTNF-R2 e ganho de peso na gestação.**

## 5.6 Correlações entre sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1 e sTNF-R2 e os parâmetros laboratoriais das gestantes com PE

Na **TABELA 12** estão representadas as correlações entre os níveis plasmáticos de sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1, sTNF-R2 e os parâmetros laboratoriais das gestantes com PE.

**TABELA 12**  
Correlações entre os níveis plasmáticos de sEng, sTNF-R1 e sTNF-R2 e os parâmetros laboratoriais das gestantes com PE

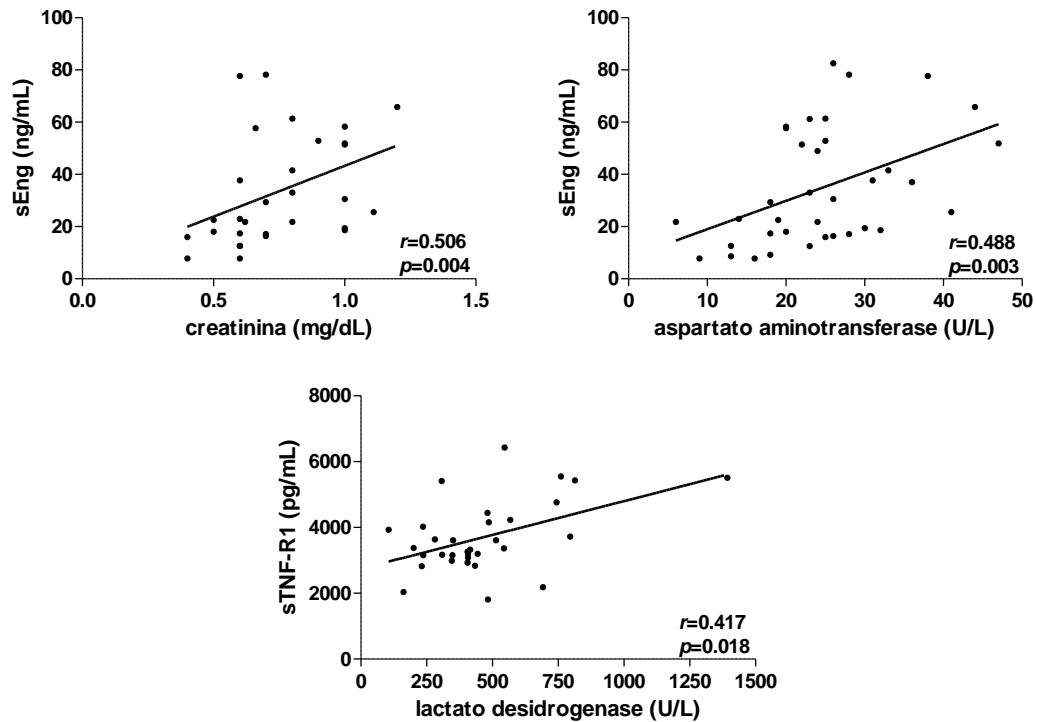
	<b>r</b>	<b>p</b>
<b>sEng</b>		
vs. número de hemácias	-0,150	0,405
vs. hemoglobina	-0,222	0,193
vs. hematócrito	-0,181	0,201
vs. número de plaquetas	0,007	0,967
vs. contagem global de leucócitos	-0,041	0,857
vs. AST	0,488	0,003*
vs. ALT	0,263	0,121
vs. ácido úrico	0,037	0,840
vs. LDH	0,166	0,381
vs. ureia	0,061	0,757
vs. creatinina	0,506	0,004*
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>		
vs. número de hemácias	0,107	0,560
vs. hemoglobina	0,125	0,470
vs. hematócrito	0,097	0,580
vs. número de plaquetas	0,124	0,522
vs. contagem global de leucócitos	-0,076	0,742
vs. AST	-0,179	0,304
vs. ALT	0,011	0,951
vs. ácido úrico	-0,230	0,213
vs. LDH	0,108	0,578
vs. ureia	-0,274	0,176
vs. creatinina	0,124	0,522
<b>sTNF-R1</b>		
vs. número de hemácias	-0,173	0,321
vs. hemoglobina	-0,149	0,365
vs. hematócrito	-0,143	0,384
vs. número de plaquetas	-0,239	0,143
vs. contagem global de leucócitos	-0,347	0,097
vs. AST	0,296	0,067
vs. ALT	-0,004	0,981
vs. ácido úrico	0,105	0,547
vs. LDH	0,417	0,018*
vs. ureia	-0,119	0,539
(cont.)		

(cont.)		
vs. creatinina	0,247	0,173
<b>sTNF-R2</b>		
vs. número de hemácias	0,108	0,538
vs. hemoglobina	0,142	0,390
vs. hematócrito	0,170	0,300
vs. número de plaquetas	-0,053	0,747
vs. contagem global de leucócitos	-0,314	0,136
vs. AST	-0,076	0,645
vs. ALT	-0,290	0,073
vs. ácido úrico	0,010	0,953
vs. LDH	-0,007	0,968
vs. ureia	-0,310	0,102
vs. creatinina	0,036	0,846

sEng: endogлина solúvel; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotranferase; LDH: lactato desidrogenase; TGF- $\beta$ 1: fator de crescimento transformante beta-1; sTNF-R1: receptor solúvel 1 do fator de necrose tumoral alfa; sTNF-R2: receptor solúvel 2 do fator de necrose tumoral alfa. vs.: *versus*; r: coeficiente de correlação de Spearman. \* $p \leq 0,05$ .

A concentração de sEng correlacionou-se positivamente com a atividade da AST ( $r=0,488$ ,  $p=0,003$ ) e com os níveis de creatinina ( $r=0,506$ ,  $p=0,004$ ) em gestantes com PE. Também foi observada uma correlação positiva entre os níveis de sTNF-R1 e a atividade da LDH ( $r=0,417$ ,  $p=0,018$ ) nesse grupo de gestantes. Os demais parâmetros laboratoriais não apresentaram associações estatisticamente significativas com os fatores plasmáticos avaliados.

Na **FIGURA 12** estão representadas as correlações estatisticamente significativas que foram detectadas entre os níveis plasmáticos de sEng, TGF- $\beta$ 1, sTNF-R1, sTNF-R2 e os parâmetros laboratoriais das gestantes com PE.



**FIGURA 12 – Correlações estatisticamente significativas entre os níveis de sEng, sTNF-R1 e sTNF-R2 e os parâmetros laboratoriais das gestantes com PE (grupo III).**

### 5.7 Análise multivariada de regressão logística dos parâmetros clínicos e dos fatores solúveis dosados

Primeiramente, considerou-se a gestação com PE e a gestação normotensa como variáveis dependentes. O modelo final de regressão linear foi composto pelas variáveis apresentadas na **TABELA 13**.

**TABELA 13**  
Modelo de regressão logística considerando como variável dependente a gestação com PE e a gestação normotensa

Parâmetro	p	OD	IC
Primigestas	0,038	0,091	0,009 - 0,871
sEng	0,002	0,669	0,522 - 0,859

GPG: ganho de peso na gestação; sEng: endoglina solúvel; OD: razão de chances; IC: intervalo de confiança. Hosmer and Lemeshow: 0,911.

De acordo com a **TABELA 13**, as variáveis primigesta e níveis plasmáticos de sEng foram associados independentemente à presença de PE quando comparado às gestantes normotensas.

Em seguida, considerou-se como variável dependente a ocorrência de PE precoce ou PE tardia. No entanto, nenhuma variável analisada foi associada independentemente à idade gestacional na qual surgiram os sintomas da PE, sendo que todas as variáveis apresentaram um valor de  $p > 0,05$  no modelo proposto.

Por fim, foram feitas análises considerando como variável dependente a ocorrência de PE leve ou PE grave. O modelo final foi composto pela variável apresentada na **TABELA 14**.

**TABELA 14**  
**Modelo de regressão logística considerando como variável dependente a ocorrência de PE grave e PE leve**

<b>Parâmetro</b>	<b>p</b>	<b>OD</b>	<b>IC</b>
<b>sEng</b>	0,014	0,923	0,866 – 0,984

sEng: endoglina solúvel; OD: razão de chances; IC: intervalo de confiança. *Hosmer and Lemeshow*: 0,199.

De acordo com a **TABELA 14**, somente a variável sEng está associada independentemente à forma grave da PE.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Características clínicas dos grupos avaliados

A idade, a idade gestacional e o IMC dos três grupos foram pareados com o objetivo de minimizar os fatores de confusão.

O ganho de peso na gestação foi significativamente superior no grupo de gestantes com PE quando comparado ao grupo de gestantes normotensas ( $p=0,024$ ). O aumento de peso de 500 g por semana ao longo da gestação é considerado normal. Na PE, o ganho de peso geralmente é súbito e devido, principalmente, à retenção hídrica excessiva, que em alguns casos pode ser evidenciado pelo edema (CUNNINGHAN, 2000). É importante salientar que o edema não é mais considerado um parâmetro diagnóstico da PE devido ao seu caráter inespecífico.

Houve maior frequência de primigestas no grupo de gestantes com PE em relação ao de gestantes normotensas ( $p=0,016$ ). A primiparidade também foi associada independentemente à ocorrência da PE. Estudos epidemiológicos sugerem que a má adaptação imune esteja envolvida na patogênese da PE e que pouca exposição ao fluido seminal contribua para a intolerância materna aos antígenos paternos presentes na placenta. Confirmando esta assertiva, tem sido visto que a PE ocorre mais frequentemente na primeira gestação, e quando há uma mudança de parceiro, o risco retorna ao da primeira gravidez. Além disso, o uso de camisinha e a inseminação artificial com espermatozoides doados são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de PE (SAITO, 2010; TROGSTAD; MAGNUS; STOLTENBERG, 2011).

A frequência de primigestas neste estudo também foi superior no subgrupo de gestantes com PE leve em comparação ao de gestantes com PE grave ( $p=0,053$ ), o que não era esperado, pois admite-se que gestantes com PE que já tiveram mais de uma gestação possivelmente toleram melhor os antígenos paternos e, com isso, tendem a desenvolver a forma leve da doença.

Três gestantes com PE apresentaram gravidez gemelar, o que não foi constatado em nenhuma das gestantes normotensas. Sabe-se que gestantes com gravidez múltipla têm risco dois a três vezes maior de desenvolver PE do que aquelas com gestação única. Esse aumento do risco provavelmente está



relacionado ao volume aumentado da placenta nas gestações múltiplas. Admite-se que a placenta desempenha um papel central na patogênese da PE, uma vez que os sinais e sintomas desaparecem após o parto e a sua retirada completa (TROGSTAD; MAGNUS; STOLTENBERG, 2011).

No presente estudo, as gestantes normotensas apresentaram pressão arterial sistólica inferior a das mulheres não gestantes ( $p=0,024$ ), embora a significância estatística não tenha sido alcançada após a correção de *Bonferroni*, o que está de acordo com a literatura. A redução dos níveis pressóricos pode decorrer da diminuição da resistência vascular sistêmica e do aumento do fluxo renal e da filtração glomerular que são observados fisiologicamente no terceiro trimestre de gestação, período gestacional em que se encontravam as gestantes normotensas (DELASCIO; LOPES, 1983; REISS *et al.*, 1987). REISS *et al.* 1987 relataram em seu estudo que gestantes normotensas exibiram um declínio da pressão arterial antes do segundo trimestre, que se manteve ao longo da gestação, e um aumento insignificante dessa foi detectado momentos antes do parto.

A pressão arterial sistólica das gestantes com PE de início precoce foi superior a das gestantes com PE de início tardio ( $p=0,027$ ), o que pode ser explicado pelo fato do primeiro grupo (90%) ter apresentado frequência maior de gestantes com a forma grave da doença do que o segundo grupo (58%).

## 6.2 Parâmetros laboratoriais do grupo III

A monitorização das gestantes com PE é usualmente realizada laboratorialmente pela avaliação do hemograma e de testes bioquímicos de função hepática (determinação da atividade das enzimas AST, ALT e LDH; níveis de bilirrubinas total, direta e indireta) e de função renal (proteinúria; níveis de ácido úrico, creatinina e ureia) (BURTIS *et al.*, 2008).

As médias das contagens de hemácias ( $4.076 \times 10^3/\text{mL}$ ), dos níveis de hemoglobina (11,5 g/dL) e dos valores do hematócrito (35%) das gestantes com PE estavam abaixo ou próximos ao limiar inferior do intervalo de referência ( $4.200 \times 10^3/\text{mL}$ , 12,0 g/dL e 37%, respectivamente). A anemia, em geral causada por carência nutricional, é frequentemente observada nas gestações e, principalmente, na PE. A suplementação da dieta com ferro e ácido fólico, é usualmente indicada ao longo da gestação para prevenir a ocorrência de anemia. Gestantes com anemia

profunda têm um risco 3,6 vezes maior de desenvolver PE em relação às gestantes sem anemia (ALI *et al.*, 2011). Essa maior suscetibilidade pode ser explicada pela deficiência de antioxidantes e de micronutrientes, como o cálcio, o zinco e o magnésio durante a gravidez de mulheres que desenvolvem PE (JAIN *et al.*, 2010). Entretanto, é preciso ter cautela ao interpretar os resultados de estudos que avaliam a interferência da carência nutricional na PE, uma vez que não existe um consenso acerca do benefício da suplementação da dieta com antioxidantes e micronutrientes na prevenção da PE (BEZERRA MAIA E HOLANDA MOURA *et al.*, 2012).

As gestantes com PE, no presente estudo, apresentaram uma contagem global de leucócitos ( $10.077 /\text{mm}^3$ ) um pouco acima do limiar superior do intervalo de referência ( $10.000 /\text{mm}^3$ ). CANZONERI *et al.* (2009) relataram que a contagem global de leucócitos estava elevada nas gestantes com PE leve e significativamente elevada naquelas com PE grave, em comparação às gestantes normotensas, no entanto estas diferenças não foram encontradas no presente estudo. TERRONE *et al.* (2000) relataram uma contagem global de leucócitos ainda maior em gestantes com síndrome HELLP. A leucocitose é considerada uma evidência de resposta inflamatória, que é leve na gestação normotensa e excessiva na PE (CANZONERI *et al.*, 2009; REDMAN; SACKS; SARGENT, 1999). Tem sido admitido que a redução da apoptose de neutrófilos relacionada ao aumento da resposta inflamatória contribua para a neutrofilia e a leucocitose observadas durante a gestação normotensa e, de forma mais evidente, na PE (CANZONERI *et al.*, 2009).

Um dos critérios de inclusão das gestantes com PE neste estudo foi proteinúria superior a 0,3g/24 horas ou  $\geq 1+$  pelo método semi-quantitativo da fita em amostra de urina isolada. Duas gestantes com PE apresentaram proteinúria de fita negativa. No entanto, essas pacientes apresentaram resultado de proteinúria superior a 0,3g/24hs alguns dias após ter sido feito o exame de proteinúria de fita. Desta forma, todas as gestantes incluídas neste trabalho apresentaram hipertensão e proteinúria.

Na análise dos resultados dos subgrupos de gestantes com PE, classificadas de acordo com a gravidade da doença, foi observado que as gestantes com PE grave apresentaram níveis aumentados de ALT em comparação àquelas com PE leve ( $p=0,040$ ), embora estivessem dentro da faixa de referência. A enzima ALT catalisa a transferência do grupamento amino da alanina para o ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, produzindo ácido pirúvico e ácido glutâmico. A ALT é considerada um

marcador de lesão hepática aguda, mas também se encontra elevada na pancreatite e no infarto agudo do miocárdio, porém em menor intensidade (BURTIS *et al.*, 2008). Esse resultado sugere que a função hepática pode estar significativamente alterada em gestantes com a forma grave da PE. De fato, um dos desfechos da PE é a síndrome HELLP, que cursa com hemólise, alteração da função hepática e elevação das enzimas produzidas por esse órgão, além da redução do número de plaquetas circulantes. Embora na prática clínica, esse desfecho possa ser evidenciado também em gestantes com PE leve, o risco é maior naquelas com a forma grave da doença (ACOG, 2002).

As duas gestantes com PE grave de início tardio que evoluíram para a síndrome HELLP apresentaram os seguintes resultados dos marcadores de hemólise e função hepática: LDH (não obtido, 1.393 U/L), AST (28 U/L, 63 U/L), ALT (13 U/L, 59 U/L); e contagem de plaquetas ( $238 \times 10^3$  /mL,  $32 \times 10^3$  /mL). Considerando que o limiar superior de normalidade do LDH é 480 U/L, da AST é 31 U/L e da ALT é 34 U/L e que o limiar inferior de normalidade da contagem de plaquetas é  $150 \times 10^3$  /mL, somente uma paciente com diagnóstico de síndrome HELLP apresentou as alterações laboratoriais esperadas durante a gestação. A gestante com PE cujos exames laboratoriais não estavam alterados durante a gestação foi diagnosticada com a síndrome após o parto.

### **6.3 Fator de crescimento transformante beta-1 (TGF- $\beta$ 1) e endoglina solúvel (sEng)**

Em concordância com estudos anteriores, os níveis plasmáticos de sEng foram superiores nas gestantes normotensas em relação às mulheres não gestantes ( $p < 0,001$ ), sugerindo que a gravidez, por si só, está associada a níveis superiores desse fator anti-angiogênico (VENKATESHA *et al.*, 2006; MASUYAMA *et al.*, 2007). O equilíbrio na produção de fatores angiogênicos é importante para o desenvolvimento placentário, caso contrário, o estímulo exacerbado determinado pelos fatores pró-angiogênicos produzidos pelo trofoblasto e células da interface materno-fetal transformaria a placenta em um grande hemangioma (DE OLIVEIRA; KARUMANCHI; SASS, 2010).

Além disso, a concentração de sEng aumentou em função da idade gestacional nas gestantes normotensas ( $p = 0,003$ ). Vários estudos relatam que a

idade materna avançada está associada, fisiologicamente, a níveis aumentados de sEng, a níveis reduzidos de PIGF e à elevação do índice (sFlt1+sEng)/PIGF (CHAIWORAPONGSA *et al.*, 2010; MASUYAMA *et al.*, 2007; STAFF *et al.*, 2009). A placenta é uma das principais fontes de fatores anti-angiogênicos. Como o avançar da idade gestacional, a placenta aumenta de tamanho, o que explicaria o pico de fatores anti-angiogênicos ao final da gestação.

Um aumento dos níveis plasmáticos de sEng nas gestantes com PE comparando-se às gestantes normotensas ( $p < 0.001$ ) foi obtido no presente estudo, o que está em concordância com relatos prévios da literatura (KIM *et al.*, 2009; REDDY *et al.*, 2009, VENKATESHA *et al.*, 2006). Além disso, uma associação independente foi obtida entre os níveis de sEng e a ocorrência da PE, confirmando o aumento de sEng na PE.

Uma correlação negativa entre os níveis sEng e a idade gestacional foi obtida para as gestantes com PE ( $p = 0,023$ ), como relatado anteriormente por outros pesquisadores (CHAIWORAPONGSA *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2009). A comparação dos níveis de sEng nos subgrupos de gestantes com PE, classificados de acordo com a idade gestacional na qual surgiram os sintomas da doença, revelou que os níveis de sEng foram superiores nas gestantes com PE precoce comparando-se às aquelas com PE tardia, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa.

Em concordância com os resultados obtidos por KIM *et al.* (2009) e VENKATESHA *et al.* (2006), a análise dos níveis plasmáticos de sEng de acordo com a gravidade da PE revelou níveis superiores em gestantes com PE grave em comparação às gestantes com PE leve ( $p = 0,005$ ). Além disso, uma associação de forma independente dos níveis plasmáticos de sEng e a gravidade da doença foi obtida. As gestantes com PE grave apresentavam pressão arterial sistólica e diastólica mais elevada do que as gestantes com a forma leve, o que era esperado considerando os critérios para classificação da forma clínica da doença (ACOG, 2002). Uma associação positiva entre os níveis plasmáticos de sEng e os níveis pressóricos foi obtida nas gestantes com PE ( $p = 0,022$ ), em concordância com o estudo de MASUYAMA *et al.* (2007). BUHIMSCHI *et al.*, 2010 também revelaram associação positiva entre os níveis pressóricos e níveis urinários de sEng tanto na PE grave, quanto na PE leve. Por outro lado, KIM *et al.* 2009 não verificaram

associação entre níveis plasmáticos de Eng e os níveis pressóricos em gestantes com PE.

A relação existente entre os níveis de sEng e a hipertensão tem sido investigada em outras doenças que envolvem disfunção endotelial. BLÁZQUEZ-MEDELA *et al.* (2010) relataram uma correlação positiva significativa entre os níveis plasmáticos de sEng e a pressão arterial sistólica em pacientes diabéticos e não diabéticos com hipertensão arterial crônica.

Sabe-se que a angiogênese desempenha um papel crítico na homeostase renal, uma vez que os glomérulos formam uma barreira funcional entre o sangue e o compartimento urinário. Estudos genéticos em camundongos sugeriram um papel importante dos fatores pró-angiogênicos VEGF e PlGF no desenvolvimento renal e na saúde vascular (TJWA *et al.*, 2003). Por outro lado, os fatores anti-angiogênicos sFlt-1 e sEng têm sido associados à lesão glomerular e proteinúria. VENKATESHA *et al.* (2006), em um estudo envolvendo ratos, relataram uma proteinúria leve no grupo tratado com sEng, uma proteinúria grave no grupo tratado com sFlt-1, e uma proteinúria necrótica no grupo tratado com sFlt-1 + sEng. Um estudo prévio com gestantes com PE revelou níveis maiores de proteinúria nas gestantes com níveis elevados de sEng em relação ao grupo de gestantes com níveis reduzidos de sEng. No entanto, a diferença obtida não foi significativa (MASUYAMA *et al.* 2007).

No presente estudo, os níveis de sEng foram associados positivamente aos níveis de creatinina nas gestantes com PE ( $p=0,004$ ). Esta associação também foi relatada em um estudo anterior que avaliou gestantes com PE precoce e grave (ZHANG, HAN Y. H., HAN Y. Z., 2010). No entanto, os dados sobre o papel da sEng na homeostase renal humana ainda são escassos.

CHARYTAN *et al.* (2011) não encontraram associação entre os níveis plasmáticos de sEng e a disfunção renal em pacientes com doença renal crônica. Em concordância, BLÁZQUEZ-MEDELA *et al.* (2010) não encontraram associação significativa entre sEng plasmática e disfunção renal em pacientes com hipertensão e diabetes, embora os níveis de sEng tenham sido maiores nos pacientes com três órgãos alvo (coração, vasos e rins) danificados do que naqueles sem lesões nesses órgãos.

Outros fatores anti-angiogênicos, como o sFlt-1, podem estar associados à disfunção renal em humanos, como foi relatado no estudo de DI MARCO *et al.* (2009). Nesse estudo, pacientes com doença renal crônica apresentam níveis

elevados de sFlt-1, um antagonista do VEGF. Tanto o soro desses pacientes quando a sFlt-1 recombinante exerceram atividade anti-angiogênica no ensaio da membrana cório-alantóide de ovo embrionado de galinha, induziram a apoptose de células endoteliais *in vitro* e diminuíram a geração de NO em duas linhagens de células endoteliais. O pré-tratamento do soro com anticorpo anti-sFlt-1 aboliu todos esses efeitos.

Os dados do presente estudo mostraram uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos de sEng e de AST em gestantes com PE ( $p=0,003$ ). Sabe-se que a função hepática pode estar significativamente alterada na PE, especialmente nas formas graves da doença e nos desfechos dessa, como a síndrome HELLP (ACOG, 2002).

VENKATESHA *et al.* (2006), em um estudo envolvendo ratos, mostraram que os grupos tratados com sEng ou sFlt-1 apresentaram um aumento de AST, mas sem alterações histológicas do fígado, ao passo que o grupo tratado simultaneamente com sEng e sFlt-1 apresentou níveis ainda mais elevados de AST e áreas de isquemia e de necrose hepática.

Uma busca na literatura não revelou estudos visando estimar a correlação entre os níveis plasmáticos de sEng e de enzimas hepáticas (AST e ALT) em gestantes com PE. Apenas um estudo envolvendo gestantes com síndrome HELLP foi encontrado. HERTIG *et al.*, 2010 relataram uma correlação positiva entre os níveis de sEng e o pico das enzimas hepáticas em gestantes com essa síndrome, mas a correlação não foi estatisticamente significativa. Por outro lado, foi obtida uma correlação positiva estatisticamente significativa entre os níveis de sFlt-1 e o pico das enzimas hepática nessas gestantes.

Considerando os dados do presente estudo e os obtidos para síndrome HELLP, pode-se especular que essas duas proteínas anti-angiogênicas, sEng e sFlt-1, contribuem de forma sinérgica para a lesão hepática, o que justificaria a correlação com os níveis de AST e ALT.

Os resultados do presente estudo mostraram níveis similares de TGF- $\beta$ 1 em gestantes com PE e gestantes normotensas, o que está em concordância com estudos prévios (HUBER *et al.*, 2002; MOLVAREC *et al.*, 2011; SZARKA *et al.*, 2010). No entanto, alguns estudos encontraram níveis elevados de TGF- $\beta$ 1 na PE em relação às gestantes normotensas (BENIAN *et al.*, 2002; FEIZOLLAHZADEH *et al.*, 2012; MADAZLI *et al.*, 2003).

Admite-se que níveis elevados de sEng podem prejudicar a sinalização do TGF- $\beta$ 1 na vasculatura, ao reduzir a quantidade de TGF- $\beta$ 1 disponível para se ligar aos seus receptores de membrana (VENKATESHA *et al.*, 2006). A ativação plaquetária é um achado comum na PE e as plaquetas ativadas são as principais fontes de TGF- $\beta$ 1 na circulação (ASSOIAN *et al.*, 1983; HOLTHE *et al.*, 2004). Dessa forma, o TGF- $\beta$ 1 secretado pelas plaquetas ativadas poderia desempenhar um papel protetor da função endotelial na PE (PERAÇOLI *et al.*, 2008). Além disso, sabe-se que o TGF- $\beta$ 1 é uma citocina imunossupressora e imunoreguladora e que níveis elevados dessa citocina podem exercer um efeito regulador da resposta inflamatória (KULKARNI; KARLSSON, 1997).

A literatura revela que poucos estudos avaliaram os níveis de TGF- $\beta$ 1 em gestantes normotensas e mulheres não gestantes e os resultados obtidos são controversos. No presente estudo, não foi observada diferença significativa nos níveis de TGF- $\beta$ 1 das gestantes normotensas e mulheres não gestantes, o que está em concordância com estudos prévios (FEIZOLLAHZADEH *et al.*, 2012; NAICKER; KHEDUN; MOODLEY, 2002; SZARKA *et al.*, 2010). Em contraste, GIL-VILLA *et al.* (2012) relataram níveis elevados de TGF- $\beta$ 1 em mulheres não gestantes em comparação às não gestantes, enquanto o oposto foi observado no estudo de AYATOLLAHI, GERAMIZADEH, SAMSAMI (2005).

Sabe-se que diversos parâmetros como, etnia, índice de massa corporal e tabagismo, podem afetar os níveis circulantes de TGF- $\beta$ 1 nas gestações com ou sem complicações. Diferenças na gravidade da PE, bem como na idade gestacional e no tamanho amostral, além das variações nos procedimentos para a obtenção e processamento de amostras de sangue e nas técnicas utilizadas para determinação podem contribuir para a divergência de resultados obtida na literatura com relação aos níveis plasmáticos de TGF- $\beta$ 1 (FEIZOLLAHZADEH *et al.*, 2012). No presente estudo, tanto as pacientes com PE quanto as gestantes normotensas estavam no terceiro trimestre de gestação e nenhuma gestante estudada era obesa. O tabagismo não foi incluído nos critérios de exclusão do estudo, devido à dificuldade na obtenção de informações precisas sobre o assunto. Além disso, a classificação étnica das mulheres incluídas no estudo não foi feita devido à elevada miscigenação característica da população brasileira.

#### 6.4 Receptores solúveis do TNF- $\alpha$

A determinação plasmática de receptores solúveis do TNF- $\alpha$ , ao invés da determinação do TNF- $\alpha$  livre na circulação, apresenta várias vantagens, conforme descrito na **seção 2.3.1**. Dessa forma, no presente estudo, optou-se pela determinação dos seus receptores solúveis. Além disso, resultados prévios, envolvendo parte das gestantes que integraram este estudo, não revelou diferença entre os níveis de TNF- $\alpha$  de gestantes com PE grave e de gestantes normotensas, como seria esperado, uma vez que é admitido um estado inflamatório exacerbado na PE grave em relação à gestação normotensa. Os níveis de TNF- $\alpha$  foram aumentados nas gestantes com PE grave em relação às mulheres não gestantes e não houve diferença comparando-se gestantes normotensas e mulheres não gestantes (PINHEIRO *et al.*, 2013).

Níveis elevados de sTNF-R1 foram detectados na PE em relação à gestação normotensa ( $p=0,014$ ), o que está de acordo com a premissa que a resposta inflamatória está exacerbada na PE (REDMAN; SACKS; SARGENT, 1999). Esse dado foi previamente relatado em outros estudos (MADAZLI *et al.*, 2003; VINCE *et al.*, 1995; WILLIAMS *et al.*, 1998). Em contraste, BOWEN *et al.*, 2001 relataram níveis semelhantes de sTNF-R1 entre gestantes com PE e gestantes normotensas. Considerando que o diagnóstico da PE é complexo e, muitas vezes uma doença renal de base justifica a hipertensão e proteinúria observadas durante a gestação, não se pode descartar equívocos na composição do grupo de estudo. Cumpre ressaltar que neste trabalho, a seleção das gestantes normotensas e com PE foi feita rigorosamente, com base nos critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos.

Neste estudo, também foi detectado um aumento dos níveis de sTNF-R1 e de sTNF-R2 no grupo de gestantes normotensas em relação ao de mulheres não gestantes ( $p<0,001$  em ambos os casos), o que está de acordo com o que tem sido admitido, ou seja, a resposta inflamatória é uma característica intrínseca da gravidez (ARNTZEN *et al.*, 1995; AUSTGULEN *et al.*, 1993). Surpreendentemente, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de sTNF-R2 comparando-se as gestantes com PE e normotensas ( $p=0,151$ ), como seria esperado, admitindo um estado inflamatório exacerbado na PE. Em concordância com os resultados obtidos no presente estudo, um estudo recente incluindo pacientes com transtorno bipolar



também revelou níveis elevados de sTNF-R1 e inalterados de sTNF-R2 comparando-se ao grupo de indivíduos saudáveis (BARBOSA *et al.*, 2011). No estudo de KUPFERMINC *et al.* (1996), as gestantes com a forma grave da doença apresentaram níveis superiores de sTNF-R2 em comparação às gestantes normotensas. No presente estudo, ambos os subgrupos de gestantes com PE leve e grave apresentaram níveis similares desse fator em relação às gestantes normotensas (dado não apresentado nos resultados).

Admite-se que o sTNF-R1 neutralize o TNF- $\alpha$  de forma mais eficiente do que o sTNF-R2. A avaliação da citotoxicidade do TNF- $\alpha$  em voluntários saudáveis após a administração de 20 unidades de LPS e incubação do plasma coletado desses indivíduos com sTNF-R1 ou sTNF-R2 revelou que a adição de concentrações fisiológicas de sTNF-R1 neutralizou significativamente a citotoxicidade de níveis endógenos de TNF- $\alpha$ . No entanto, uma concentração 100 vezes maior de sTNF-R2 foi necessária para atingir o mesmo efeito, o que demonstra a eficácia do sTNF-R1 para neutralizar o TNF- $\alpha$  (VAN ZEE *et al.*, 1992).

BECKMANN *et al.* (1997) demonstraram que a liberação fisiológica dos receptores solúveis do TNF- $\alpha$  na circulação materna aumenta em função da idade gestacional e decai após o parto. Estes pesquisadores obtiveram em gestantes normotensas, um pico da concentração plasmática de sTNF-R1 na idade gestacional mediana de 38,2 semanas e de sTNF-R2 em 25,4 semanas. De forma semelhante, SIBAI *et al.* (2009) demonstraram, em gestantes que desenvolveram PE, que os níveis plasmáticos de ambos os receptores solúveis eram maiores na idade gestacional de 24 a 28 semanas em relação à idade gestacional de 13 a 26 semanas, indicando que, também nessa doença, a concentração desses fatores aumenta com o avançar da idade gestacional. Em concordância, a comparação dos níveis de receptores solúveis do TNF- $\alpha$  nos subgrupos de gestantes com PE, classificadas de acordo com a idade gestacional na qual surgiram os sintomas, revelou que ambos sTNF-R1 e sTNF-R2 estavam elevados nas gestantes com PE tardia em comparação às gestantes com PE precoce ( $p=0,004$  e  $p=0,003$ , respectivamente). A correlação positiva encontrada entre a idade gestacional e os níveis de sTNF-R1 ( $p=0,004$ ) e de sTNF-R2 ( $p<0,001$ ) em pacientes com PE corrobora com os resultados de SIBAI *et al.*, 2009.

A comparação dos níveis de receptores solúveis do TNF- $\alpha$  nos subgrupos de gestantes com PE, classificadas de acordo com a gravidade da PE revelou níveis

similares de ambos os receptores solúveis em gestantes com as formas grave e leve da doença (sTNF-R1:  $p=0,723$ ; sTNF-R2:  $p=0,421$ ). Este resultado não era o esperado, sabendo que a forma grave da PE está associada à exacerbação da resposta inflamatória, que, em geral, cursa com elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 (XIAO *et al.*, 2012; PINHEIRO *et al.*, 2013). Uma revisão da literatura não revelou estudos comparando os níveis de receptores solúveis do TNF- $\alpha$  entre gestantes com as formas grave e leve da PE.

O subgrupo com PE precoce, continha 90% de gestantes com a forma grave da doença, enquanto o subgrupo com PE tardia continha apenas 58%. Níveis aumentados de ambos receptores solúveis no grupo com PE tardia em relação àquele com PE precoce reforça a premissa do aumento progressivo desses receptores ao longo da idade gestacional e novamente mostra que o agravamento da doença não foi associado à elevação dos níveis plasmáticos de sTNF-R1 e sTNF-R2 no presente estudo.

Uma busca na literatura revelou que poucos estudos avaliaram os receptores solúveis do TNF- $\alpha$  na PE e não foram encontrados estudos nos quais as gestantes com PE no terceiro trimestre de gestação foram estratificadas de acordo com a idade gestacional na qual a doença se instalou (PE precoce ou tardia).

Diversos estudos têm mostrado que os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e o TNF- $\alpha$ , elevam-se em função da idade em indivíduos aparentemente saudáveis. Uma das teorias propostas para a elevação desses marcadores inflamatórios é a de que o processo de envelhecimento está associado a um maior dano oxidativo celular, o qual evoca uma resposta inflamatória (SINGH; NEWMAN, 2011). Nas gestantes com PE, os níveis plasmáticos de sTNF-R2 correlacionaram positivamente com a idade ( $p=0,05$ ). Tem sido admitido que a PE resulta em lesão oxidativa e resposta inflamatória pronunciada, o que explicaria a associação entre os níveis de sTNF-R2, e a idade nessas pacientes. No entanto, cumpre ressaltar que a mediana da idade das gestantes com PE neste estudo foi de 26 anos, o que sugere prudência para fazer especulações da relação idade e níveis de marcadores inflamatórios.

Foi obtida uma correlação positiva entre o ganho de peso na gestação e os níveis plasmáticos de sTNF-R2 na PE ( $p=0,004$ ) neste estudo. O ganho de peso ponderal é maior na PE do que na gestação normotensa, principalmente devido à retenção hídrica excessiva (CUNNINGHAM, 2000), mas também pode estar

relacionado ao aumento do tecido adiposo durante a gestação. Tem sido sugerido o aumento do estresse oxidativo placentário e da peroxidação lipídica na fisiopatologia da PE (EILAND, NZERUE, FAULKNER; 2012). Pode-se especular que o ganho de peso na gestação estaria associado ao estresse oxidativo e a inflamação crônica observados na PE. Um estudo recente mostrou que a obesidade e o aumento patológico do peso são fatores que influenciam a ocorrência da PE tardia, reforçando o papel da inflamação sistêmica materna na sua fisiopatologia (ORNAGHI *et al.*, 2013). A associação independente entre o ganho de peso na gestação e a ocorrência da PE encontrada em nosso estudo corrobora com os achados descritos anteriormente.

Os níveis de sTNF-R1 mostraram uma correlação positiva com os níveis de LDH na PE ( $p=0,018$ ). Um aumento dos níveis de LDH pode ser atribuído à disfunção hepática e à hemólise que ocorrem especialmente na síndrome HELLP (ACOG, 2002). A interação do TNF- $\alpha$  e seu receptor TNF-R1, presente nos hepatócitos, resulta na ativação de vias de transdução de sinais que regulam tanto a sobrevivência, quanto a morte celular. No entanto, os mecanismos envolvidos na ativação dessas vias são, ainda, desconhecidos. Inibidores do TNF- $\alpha$  atenuam a lesão hepática em modelos animais, sugerindo que a redução dos níveis locais de TNF- $\alpha$  seja benéfica (SHUH *et al.*, 2013). Sabe-se que a liberação de sTNF-R1 diminui a disponibilidade do TNF- $\alpha$  como ligante (DIEZ-RUIZ *et al.*, 1995). Dessa forma, é possível inferir que níveis elevados de sTNF-R1 possam exercer um efeito protetor nos hepatócitos de gestantes com PE. Nenhum estudo avaliando a associação entre os níveis circulantes dos receptores solúveis do TNF- $\alpha$  e os níveis de LDH na PE foi encontrado na literatura.

Uma das limitações do presente estudo foi a possível interferência dos medicamentos utilizados pelas gestantes com PE, uma vez que, por questões éticas, a medicação não foi suspensa para a coleta de sangue. WALLACE *et al.* (2013) relataram que a administração intravenosa de dexametasona diminuiu os níveis de circulantes de TNF- $\alpha$ , IL-6, sFlt-1 e sEng em gestantes com síndrome HELLP. Nesse estudo, foi utilizado o protocolo Mississipi, no qual são administrados 10mg de dexametasona em intervalos de 12 horas até a normalização dos níveis de plaquetas. Posteriormente, são administradas duas doses de 5mg de dexametasona, com um intervalo de 12 horas entre cada dose, antes do parto para minimizar o risco de recorrência da trombocitopenia. No presente estudo 40% das

gestantes com PE receberam corticoides (2 doses de 12mg de betametasona com intervalo de 24 horas entre cada dose, ou 6mg de dexametasona de 12 em 12 horas por 2 dias), visando a maturação pulmonar do feto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Embora admita-se que essas doses não sejam suficientes para reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias e de fatores anti-angiogênicos, essa hipótese não pode ser descartada.

A terapia anti-hipertensiva foi administrada a 74% das gestantes com PE, sendo que 38% dessas fizeram uso de mais de um anti-hipertensivo simultaneamente. A nifedipina foi administrada a 78% das gestantes, metildopa a 47% e hidralazina a 9%. Além disso, 33% das gestantes com PE utilizaram sulfato de magnésio, para prevenir a ocorrência de convulsões, 30% utilizaram anti-inflamatório não esteroide (dipirona ou paracetamol) como analgésico, 16% utilizaram misoprostol para induzir o parto e 14% um antiespasmódico, a hioscina.

## 6.5 Considerações finais

A investigação do provável papel da sEng na patogênese da PE é recente. VENKATESHA *et al.* (2006) foram os primeiros pesquisadores que avaliaram os níveis de sEng em gestantes com PE e com síndrome HELLP. Embora a avaliação dos receptores solúveis do TNF- $\alpha$ , tenha sido proposta há mais de 20 anos, os estudos publicados investigando esses receptores, especialmente na PE, são escassos. Cumpre ressaltar o caráter inédito do presente estudo, ao avaliar esses receptores nas diferentes formas de classificação clínica da PE (leve, grave, precoce e tardia). Além disso, ressalta-se que este foi o primeiro estudo investigando sEng, sTNF-R1 e sTNF-R2 nas gestantes com PE no Brasil.

O estabelecimento de correlações entre os níveis de sEng, TGF- $\beta$ 1 e receptores solúveis do TNF com os parâmetros clínicos e laboratoriais, associados à PE, poderá constituir uma referência para estudos futuros e auxiliar o entendimento da complexa fisiopatologia dessa doença.

## 6.6 Perspectivas de estudos futuros

Realizar estudos prospectivos com o objetivo de analisar os níveis de marcadores de angiogênese e inflamação ao longo da gestação.

Investigar os níveis de anexina A1 (uma proteína anti-inflamatória) na PE e comparar os níveis dessa proteína nas gestantes com PE que receberam ou não glicocorticoides, uma vez que sua síntese é induzida por corticoides.

Investigar as vias sinalizadoras intracelulares envolvidas na inflamação e os mecanismos de apoptose na PE.

## 6.7 Limitações do estudo

Apesar da rigidez no seguimento dos critérios de inclusão e exclusão para seleção das gestantes, eliminando todos os casos duvidosos, não se pode excluir a possibilidade de um viés de seleção, uma vez que as gestantes foram recrutadas em quatro maternidades distintas. Além disso, o tamanho amostral avaliado pode ser responsável pela ausência de diferenças significativas entre parâmetros como TGF- $\beta$ . Em adição, os níveis dos fatores avaliados podem sofrer alterações em função da etnia, a qual não foi investigada devido à alta miscigenação da população brasileira. Além disso, não foi possível excluir pacientes em uso de medicamentos que poderiam potencialmente interferir nas análises, uma vez que a politerapia é comum em pacientes com PE.

## 7 CONCLUSÕES

As principais conclusões deste estudo foram as seguintes:

- A gravidez é uma condição fisiologicamente associada a níveis aumentados de sEng, sTNF-R1 e sTNF-R2 do que o estado não gravídico.
- A PE está associada a um desequilíbrio de fatores angiogênicos e inflamatórios em relação à gestação normotensa.
- A primiparidade e os níveis de sEng estão associados de forma independente com a ocorrência de PE, enquanto os níveis de sEng estão associados de forma independente com a gravidade da doença.

## REFERÊNCIAS

AAGAARD-TILLERY, K. M.; BELFORT, M. A. Eclampsia: morbidity, mortality, and management. **Clin Obstet Gynecol**, v. 48, n. 1, p. 12-23, Mar 2005.

ABILDGAARD, U.; HEIMDAL, K. Pathogenesis of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count (HELLP): a review. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 166, n. 2, p. 117-23, Feb 2013.

ALI, A. A. *et al.* Severe anaemia is associated with a higher risk for preeclampsia and poor perinatal outcomes in Kassala hospital, eastern Sudan. **BMC Res Notes**, v. 4, p. 311, 2011.

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS. ACOG practice bulletin: clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. **Obstet Gynecol**, v. 99, n. 1, p. 159-67, Jan 2002.

ANDERSON, H. D.; RAHMUTULA, D.; GARDNER, D. G. Tumor necrosis factor-alpha inhibits endothelial nitric-oxide synthase gene promoter activity in bovine aortic endothelial cells. **J Biol Chem**, v. 279, n. 2, p. 963-9, Jan 2004.

ARNTZEN, K. J. *et al.* Soluble tumor necrosis factor receptor in serum and urine throughout normal pregnancy and at delivery. **Am J Reprod Immunol**, v. 34, n. 3, p. 163-9, Sep 1995.

ASSOIAN, R. K. *et al.* Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. **J Biol Chem**, v. 258, n. 11, p. 7155-60, Jun 1983.

ASTIN, M.; SCOTT, J. R.; WORLEY, R. J. Pre-eclampsia/eclampsia: a fatal father factor. **Lancet**, v. 2, n. 8245, p. 533, Sep 1981.

AUSTGULEN, R. *et al.* Increased levels of soluble tumor necrosis factor-alpha receptors in serum from pregnant women and in serum and urine samples from newborns. **Pediatr Res**, v. 33, n. 1, p. 82-7, Jan 1993.

AYATOLLAHI, M.; GERAMIZADEH, B.; SAMSAMI, A. Transforming growth factor beta-1 influence on fetal allografts during pregnancy. **Transplant Proc**, v. 37, n. 10, p. 4603-4, Dec 2005.

BAINBRIDGE, S. A.; SIDLE, E. H.; SMITH, G. N. Direct placental effects of cigarette smoke protect women from pre-eclampsia: the specific roles of carbon monoxide and antioxidant systems in the placenta. **Med Hypotheses**, v. 64, n. 1, p. 17-27, 2005.

BARBARA, N. P.; WRANA, J. L.; LETARTE, M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. **J Biol Chem**, v. 274, n. 2, p. 584-94, Jan 1999.

BARBOSA, I. G. *et al.* Increased plasma levels of soluble TNF receptor I in patients with bipolar disorder. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, v. 261, n. 2, p. 139-43, Mar 2011.

BECKMANN, I. *et al.* Circulating bioactive tumor necrosis factor-alpha, tumor necrosis factor-alpha receptors, fibronectin, and tumor necrosis factor-alpha inducible cell adhesion molecule VCAM-1 in uncomplicated pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 177, n. 5, p. 1247-52, Nov 1997.

BENIAN, A. *et al.* Plasma and placental levels of interleukin-10, transforming growth factor-beta1, and epithelial-cadherin in preeclampsia. **Obstet Gynecol**, v. 100, n. 2, p. 327-31, Aug 2002.

BETTELLI, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235-8, May 2006.

BEZERRA MAIA E HOLANDA MOURA, S. *et al.* Prevention of preeclampsia. **J Pregnancy**, v. 2012, p. 435090, 2012.

BICK, R. L. Syndromes of disseminated intravascular coagulation in obstetrics, pregnancy, and gynecology. Objective criteria for diagnosis and management. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 14, n. 5, p. 999-1044, Oct 2000.

BLÁZQUEZ-MEDELA, A. M. *et al.* Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. **BMC Med**, v. 8, p. 86, 2010.

BOTCHKINA, G. I. *et al.* Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia. **Mol Med**, v. 3, n. 11, p. 765-81, Nov 1997.



BOURDEAU, A.; DUMONT, D. J.; LETARTE, M. A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. **J Clin Invest**, v. 104, n. 10, p. 1343-51, Nov 1999.

BOWEN, R. S. *et al.* Systemic inflammatory indices in pre-eclampsia and eclampsia. **J Obstet Gynaecol**, v. 21, n. 6, p. 563-9, Nov 2001.

BROCKHAUS, M. Soluble TNF receptor: what is the significance? **Intensive Care Med**, v. 23, n. 8, p. 808-9, Aug 1997.

BUHIMSCHI, C. S. *et al.* The role of urinary soluble endoglin in the diagnosis of pre-eclampsia: comparison with soluble fms-like tyrosine kinase 1 to placental growth factor ratio. **BJOG**, v. 117, n. 3, p. 321-30, Feb 2010.

BURTIS, C. A., ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. **Tietz fundamentos de química clínica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

CANZONERI, B. J. *et al.* Increased neutrophil numbers account for leukocytosis in women with preeclampsia. **Am J Perinatol**, v. 26, n. 10, p. 729-32, Nov 2009.

CHAIWORAPONGSA, T. *et al.* Plasma soluble endoglin concentration in pre-eclampsia is associated with an increased impedance to flow in the maternal and fetal circulations. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 35, n. 2, p. 155-62, Feb 2010.

CHARYTAN, D. M. *et al.* Circulating endoglin concentration is not elevated in chronic kidney disease. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e23718, 2011.

CNATTINGIUS, S. *et al.* The paradoxical effect of smoking in preeclamptic pregnancies: smoking reduces the incidence but increases the rates of perinatal mortality, abruptio placentae, and intrauterine growth restriction. **Am J Obstet Gynecol**, v. 177, n. 1, p. 156-61, Jul 1997.

CONDE-AGUDELO, A. *et al.* Cigarette smoking during pregnancy and risk of preeclampsia: a systematic review. **Am J Obstet Gynecol**, v. 181, n. 4, p. 1026-35, Oct 1999.

COOK, E. B. *et al.* Regulation of the receptor for TNF $\alpha$ , TNFR1, in human conjunctival epithelial cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 49, n. 9, p. 3992-8, Sep 2008.

CRAICI, I.; WAGNER, S.; GAROVIC, V. D. Preeclampsia and future cardiovascular risk: formal risk factor or failed stress test? **Ther Adv Cardiovasc Dis**, v. 2, n. 4, p. 249-59, Aug 2008.

CUNNINGHAM, F. G. **Williams Obstetrícia**. 20. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2000.

DAVEY, D. A.; MACGILLIVRAY, I. The classification and definition of the hypertensive disorders of pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 158, n. 4, p. 892-8, Apr 1988.

DE CAESTECKER, M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 15, n. 1, p. 1-11, Feb 2004.

DE OLIVEIRA, L. G.; KARUMANCHI, A.; SASS, N. [Preeclampsia: oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction]. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 32, n. 12, p. 609-16, Dec 2010.

DE VIVO, A. *et al.* Endoglin, PlGF and sFlt-1 as markers for predicting preeclampsia. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 87, n. 8, p. 837-42, 2008.

DEKKER, G. A. *et al.* Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 173, n. 4, p. 1042-8, Oct 1995.

DECKERS, M. M. *et al.* Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. **Endocrinology**, v. 143, n. 4, p. 1545-53, Apr 2002.

DELASCIO, D.; LOPES, A. C. **Hipertensão na gravidez**. São Paulo: Salvier, 1983.

DERYNCK, R.; ZHANG, Y. Intracellular signalling: the mad way to do it. **Curr Biol**, v. 6, n. 10, p. 1226-9, Oct 1996.

DIEZ-RUIZ, A. *et al.* Soluble receptors for tumour necrosis factor in clinical laboratory diagnosis. **Eur J Haematol**, v. 54, n. 1, p. 1-8, Jan 1995.

DI MARCO, G. S. *et al.* The soluble VEGF receptor sFlt1 contributes to endothelial dysfunction in CKD. **J Am Soc Nephrol**, v. 20, n. 10, p. 2235-45, Oct 2009.

DUSSE, L. M. *et al.* Is there a link between endothelial dysfunction, coagulation activation and nitric oxide synthesis in preeclampsia? **Clin Chim Acta**, v. 415, p. 226-9, Jan 2013.

EILAND, E.; NZERUE, C.; FAULKNER, M. Preeclampsia 2012. **J Pregnancy**, v. 2012, p. 586578, 2012.

ENGELMANN, H.; NOVICK, D.; WALLACH, D. Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. **J Biol Chem**, v. 265, n. 3, p. 1531-6, Jan 1990.

ENGLAND, L.; ZHANG, J. Smoking and risk of preeclampsia: a systematic review. **Front Biosci**, v. 12, p. 2471-83, 2007.

FANG, M. *et al.* Alterations of serum and placental endoglin in pre-eclampsia. **J Int Med Res**, v. 38, n. 1, p. 43-51, 2010 Jan-Feb 2010.

FEIZOLLAHZADEH, S. *et al.* Promoter region polymorphisms in the transforming growth factor beta-1 (TGF $\beta$ 1) gene and serum TGF $\beta$ 1 concentration in preeclamptic and control Iranian women. **J Reprod Immunol**, v. 94, n. 2, p. 216-21, Jun 2012.

FINLEY, B. E. Acute coagulopathy in pregnancy. **Med Clin North Am**, v. 73, n. 3, p. 723-43, May 1989.

FONSATTI, E.; MAIO, M. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. **J Transl Med**, v. 2, n. 1, p. 18, Jun 2004.

GALTON, M.; MERRITT, K.; BELLER, F. K. Coagulation studies on the peripheral circulation of patients with toxemia of pregnancy: a study for the evaluation of disseminated intravascular coagulation in toxemia. **J Reprod Med**, v. 6, n. 2, p. 78-89, Feb 1971.

GHORESCHI, K. *et al.* Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- $\beta$  signalling. **Nature**, v. 467, n. 7318, p. 967-71, Oct 2010.

GIL-VILLA, A. M. *et al.* Aspirin triggered-lipoxin A4 reduces the adhesion of human polymorphonuclear neutrophils to endothelial cells initiated by preeclamptic plasma.

**Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 87, n. 4-5, p. 127-34, 2012 Oct-Nov 2012.

GILBERT, J. S.; NIJLAND, M. J.; KNOBLICH, P. Placental ischemia and cardiovascular dysfunction in preeclampsia and beyond: making the connections. **Expert Rev Cardiovasc Ther**, v. 6, n. 10, p. 1367-77, Nov 2008.

GORDON, K. J.; BLOBE, G. C. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1782, n. 4, p. 197-228, Apr 2008.

GOUGOS, A.; LETARTE, M. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. **J Biol Chem**, v. 265, n. 15, p. 8361-4, May 1990.

GOUGOS, A. *et al.* Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts. **Int Immunol**, v. 4, n. 1, p. 83-92, Jan 1992.

GOUMANS, M. J. *et al.* Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. **EMBO J**, v. 21, n. 7, p. 1743-53, Apr 2002.

GUTTMACHER, A. E.; MARCHUK, D. A.; WHITE, R. I. Hereditary hemorrhagic telangiectasia. **N Engl J Med**, v. 333, n. 14, p. 918-24, Oct 1995.

HALL, D. R. *et al.* Expectant management of early onset, severe pre-eclampsia: perinatal outcome. **BJOG**, v. 107, n. 10, p. 1258-64, Oct 2000.

HASSAN, T. J.; SADARUDDIN, A.; JAFAREY, S. N. Serum calcium, urea and uric acid levels in pre-eclampsia. **J Pak Med Assoc**, v. 41, n. 8, p. 183-5, Aug 1991.

HERTIG, A. *et al.* Soluble endoglin in preeclamptic patients with or without HELLP syndrome. **Am J Obstet Gynecol**, v. 202, n. 6, p. 594.e1-4, Jun 2010.

HOLTHE, M. R. *et al.* Different levels of platelet activation in preeclamptic, normotensive pregnant, and nonpregnant women. **Am J Obstet Gynecol**, v. 190, n. 4, p. 1128-34, Apr 2004.

HUBER, A. *et al.* Transforming growth factor-beta 1 serum levels in pregnancy and pre-eclampsia. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 81, n. 2, p. 168-71, Feb 2002.

INNES, K. E.; BYERS, T. E. Preeclampsia and breast cancer risk. **Epidemiology**, v. 10, n. 6, p. 722-32, Nov 1999.

JAIN, S. *et al.* The role of calcium, magnesium, and zinc in pre-eclampsia. **Biol Trace Elem Res**, v. 133, n. 2, p. 162-70, Feb 2010.

JERKIC, M. *et al.* Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. **FASEB J**, v. 18, n. 3, p. 609-11, Mar 2004.

JEYABALAN, A. *et al.* Circulating and placental endoglin concentrations in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction and preeclampsia. **Placenta**, v. 29, n. 6, p. 555-63, Jun 2008.

KAITU'U-LINO, T. J. *et al.* MMP-14 is expressed in preeclamptic placentas and mediates release of soluble endoglin. **Am J Pathol**, v. 180, n. 3, p. 888-94, Mar 2012.

KARUMANCHI, S. A.; EPSTEIN, F. H. Placental ischemia and soluble fms-like tyrosine kinase 1: cause or consequence of preeclampsia? **Kidney Int**, v. 71, n. 10, p. 959-61, May 2007.

KHONG, T. Y. *et al.* Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 93, n. 10, p. 1049-59, Oct 1986.

KIM, Y. N. *et al.* The relationship of the level of circulating antiangiogenic factors to the clinical manifestations of preeclampsia. **Prenat Diagn**, v. 29, n. 5, p. 464-70, May 2009.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 11, p. 4651-5, Jun 1991.

KULKARNI, A. B.; KARLSSON, S. Inflammation and TGF beta 1: lessons from the TGF beta 1 null mouse. **Res Immunol**, v. 148, n. 7, p. 453-6, Sep 1997.

KUPFERMINC, M. J. *et al.* Soluble tumor necrosis factor receptors and interleukin-6 levels in patients with severe preeclampsia. **Obstet Gynecol**, v. 88, n. 3, p. 420-7, Sep 1996.

\_\_\_\_\_. Tumor necrosis factor-alpha is elevated in plasma and amniotic fluid of patients with severe preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 170, n. 6, p. 1752-7; discussion 1757-9, Jun 1994.

LAIN, K. Y.; ROBERTS, J. M. Contemporary concepts of the pathogenesis and management of preeclampsia. **JAMA**, v. 287, n. 24, p. 3183-6, Jun 2002.

LAM, C.; LIM, K. H.; KARUMANCHI, S. A. Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. **Hypertension**, v. 46, n. 5, p. 1077-85, Nov 2005.

LASTRES, P. *et al.* Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. **Eur J Immunol**, v. 22, n. 2, p. 393-7, Feb 1992.

LAURENTI, R.; JORGE, M. H. P. M.; GOTLIEB, S. L. D. A mortalidade materna nas capitais brasileiras: algumas características e estimativa de um fator de ajuste. **Rev Bras Epidemiol**. v. 7, n. 4, p. 449-60, 2004.

LI, C. *et al.* CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. **FASEB J**, v. 14, n. 1, p. 55-64, Jan 2000.

\_\_\_\_\_. CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 13, p. 2677-85, Jul 2003.

LI, D. Y. *et al.* Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. **Science**, v. 284, n. 5419, p. 1534-7, May 1999.

LI, M. O.; FLAVELL, R. A. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 468-76, Apr 2008.

LÓPEZ-NOVOA, J. M.; BERNABEU, C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 299, n. 4, p. H959-74, Oct 2010.

LUNDIN-SCHILLER, S.; MITCHELL, M. D. Prostaglandin production by human chorion laeve cells in response to inflammatory mediators. **Placenta**, v. 12, n. 4, p. 353-63, 1991 Jul-Aug 1991.

LURIE, S.; FEINSTEIN, M.; MAMET, Y. Disseminated intravascular coagulopathy in pregnancy: thorough comprehension of etiology and management reduces obstetricians' stress. **Arch Gynecol Obstet**, v. 263, n. 3, p. 126-30, Feb 2000.

MACEWAN, D. J. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. **Cell Signal**, v. 14, n. 6, p. 477-92, Jun 2002.

MACKAY, A. P.; BERG, C. J.; ATRASH, H. K. Pregnancy-related mortality from preeclampsia and eclampsia. **Obstet Gynecol**, v. 97, n. 4, p. 533-8, Apr 2001.

MADAZLI, R. *et al.* Maternal plasma levels of cytokines in normal and preeclamptic pregnancies and their relationship with diastolic blood pressure and fibronectin levels. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 82, n. 9, p. 797-802, Sep 2003.

MAGGI, E. *et al.* Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. **J Immunol**, v. 148, n. 7, p. 2142-7, Apr 1992.

MASSAGUÉ, J. *et al.* TGF-beta receptors and TGF-beta binding proteoglycans: recent progress in identifying their functional properties. **Ann N Y Acad Sci**, v. 593, p. 59-72, 1990.

MASUYAMA, H. *et al.* Correlation between soluble endoglin, vascular endothelial growth factor receptor-1, and adipocytokines in preeclampsia. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 7, p. 2672-9, Jul 2007.

MAYNARD, S. E. *et al.* Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. **J Clin Invest**, v. 111, n. 5, p. 649-58, Mar 2003.

MCALLISTER, K. A. *et al.* Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. **Nat Genet**, v. 8, n. 4, p. 345-51, Dec 1994.

MCCARTNEY-FRANCIS, N. L.; WAHL, S. M. Transforming growth factor beta: a matter of life and death. **J Leukoc Biol**, v. 55, n. 3, p. 401-9, Mar 1994.

MCCRAE, K. R. Thrombocytopenia in pregnancy. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2010, p. 397-402, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Gestação de alto risco: manual técnico**. 5. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. p. 82.

MOHAMED, F. *et al.* Lack of role for nitric oxide (NO) in the selective destabilization of endothelial NO synthase mRNA by tumor necrosis factor-alpha. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 15, n. 1, p. 52-7, Jan 1995.

MOLVAREC, A. *et al.* Serum leptin levels in relation to circulating cytokines, chemokines, adhesion molecules and angiogenic factors in normal pregnancy and preeclampsia. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 9, p. 124, 2011.

MUZAFFAR, S. *et al.* Role of the endothelium and nitric oxide synthases in modulating superoxide formation induced by endotoxin and cytokines in porcine pulmonary arteries. **Thorax**, v. 58, n. 7, p. 598-604, Jul 2003.

NAICKER, T.; KHEDUN, S. M.; MOODLEY, J. Transforming growth factor beta(1) levels in platelet depleted plasma in African women with pre-eclampsia. **J Obstet Gynaecol**, v. 22, n. 3, p. 279-82, May 2002.

NOPHAR, Y. *et al.* Soluble forms of tumor necrosis factor receptors (TNF-Rs). The cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor. **EMBO J**, v. 9, n. 10, p. 3269-78, Oct 1990.

NÚÑEZ-GONZÁLEZ, J. R.; SANABRIA-VERA, C. J.; ROMERO-ADRIÁN, T. [Measurement of the serum concentrations of tumor necrosis factor alpha and its soluble receptors in normal and pre-eclamptic pregnant patients]. **Invest Clin**, v. 42, n. 3, p. 171-81, Sep 2001.

ONYANGUNGA, O. A.; MOODLEY, J. Managing pregnancy with HIV, HELLP syndrome and low platelets. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 26, n. 1, p. 133-47, Feb 2012.

OPSIJØN, S. L. *et al.* Soluble tumor necrosis factor receptors and soluble interleukin-6 receptor in fetal and maternal sera, coelomic and amniotic fluids in normal and pre-eclamptic pregnancies. **J Reprod Immunol**, v. 29, n. 2, p. 119-34, Jul 1995.



ORNAGHI, S. *et al.* Influencing factors for late-onset preeclampsia. **J Matern Fetal Neonatal Med**, Apr 2013.

PERAÇOLI, M. T. *et al.* Platelet aggregation and TGF-beta(1) plasma levels in pregnant women with preeclampsia. **J Reprod Immunol**, v. 79, n. 1, p. 79-84, Oct 2008.

PETROZELLA, L. *et al.* Endothelial microparticles and the antiangiogenic state in preeclampsia and the postpartum period. **Am J Obstet Gynecol**, v. 207, n. 2, p. 140.e20-6, Aug 2012.

PINHEIRO, M. B. *et al.* Severe preeclampsia goes along with a cytokine network disturbance towards a systemic inflammatory state. **Cytokine**, v. 62, n. 1, p. 165-73, Apr 2013.

POLLHEIMER, J.; KNÖFLER, M. The role of the invasive, placental trophoblast in human pregnancy. **Wien Med Wochenschr**, v. 162, n. 9-10, p. 187-90, May 2012.

POWE, C. E.; LEVINE, R. J.; KARUMANCHI, S. A. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. **Circulation**, v. 123, n. 24, p. 2856-69, Jun 2011.

RAPOPORT, R. M.; DRAZNIN, M. B.; MURAD, F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. **Nature**, v. 306, n. 5939, p. 174-6, 1983 Nov 10-16 1983.

REDDY, A. *et al.* Maternal circulating levels of activin A, inhibin A, sFlt-1 and endoglin at parturition in normal pregnancy and pre-eclampsia. **PLoS One**, v. 4, n. 2, p. e4453, 2009.

REDMAN, C. W.; SACKS, G. P.; SARGENT, I. L. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 180, n. 2 Pt 1, p. 499-506, Feb 1999.

REDMAN, C. W.; SARGENT, I. L. Latest advances in understanding preeclampsia. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1592-4, Jun 2005.

REISS, R. E. *et al.* Retrospective comparison of blood pressure course during preeclamptic and matched control pregnancies. **Am J Obstet Gynecol**, v. 156, n. 4, p. 894-8, Apr 1987.

Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 183, n. 1, p. S1-S22, Jul 2000.

ROMAGNANI, S. Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response? **Immunol Today**, v. 13, n. 10, p. 379-81, Oct 1992.

ROTHER, J. *et al.* Tumor necrosis factor receptors--structure and function. **Immunol Res**, v. 11, n. 2, p. 81-90, 1992.

SAITO, S. Th17 cells and regulatory T cells: new light on pathophysiology of preeclampsia. **Immunol Cell Biol**, v. 88, n. 6, p. 615-7, Aug 2010.

SAITO, S. *et al.* Inadequate tolerance induction may induce pre-eclampsia. **J Reprod Immunol**, v. 76, n. 1-2, p. 30-9, Dec 2007.

SANTNER-NANAN, B. *et al.* Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. **J Immunol**, v. 183, n. 11, p. 7023-30, Dec 2009.

SHUH, M. *et al.* Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ : Life and Death of Hepatocytes During Liver Ischemia/Reperfusion Injury. **Ochsner J**, v. 13, n. 1, p. 119-30, 2013.

SIBAI, B. *et al.* Maternal plasma concentrations of the soluble tumor necrosis factor receptor 2 are increased prior to the diagnosis of preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 200, n. 6, p. 630.e1-8, Jun 2009.

SIBAI, B. M. Diagnosis, prevention, and management of eclampsia. **Obstet Gynecol**, v. 105, n. 2, p. 402-10, Feb 2005.

\_\_\_\_\_. Etiology and management of postpartum hypertension-preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 206, n. 6, p. 470-5, Jun 2012.

SIBAI, B. M. *et al.* Maternal morbidity and mortality in 442 pregnancies with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP syndrome). **Am J Obstet Gynecol**, v. 169, n. 4, p. 1000-6, Oct 1993.

SINGH, T.; NEWMAN, A. B. Inflammatory markers in population studies of aging. **Ageing Res Rev**, v. 10, n. 3, p. 319-29, Jul 2011.

SLUNGAARD, A. *et al.* Tumor necrosis factor alpha/cachectin stimulates eosinophil oxidant production and toxicity towards human endothelium. **J Exp Med**, v. 171, n. 6, p. 2025-41, Jun 1990.

SOTO, E. *et al.* Late-onset preeclampsia is associated with an imbalance of angiogenic and anti-angiogenic factors in patients with and without placental lesions consistent with maternal underperfusion. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 25, n. 5, p. 498-507, May 2012.

ST-JACQUES, S. *et al.* Localization of endoglin, a transforming growth factor-beta binding protein, and of CD44 and integrins in placenta during the first trimester of pregnancy. **Biol Reprod**, v. 51, n. 3, p. 405-13, Sep 1994.

STAFF, A. C. *et al.* Circulating concentrations of soluble endoglin (CD105) in fetal and maternal serum and in amniotic fluid in preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 197, n. 2, p. 176.e1-6, Aug 2007.

\_\_\_\_\_. Elevated level of free 8-iso-prostaglandin F2alpha in the decidua basalis of women with preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 181, n. 5 Pt 1, p. 1211-5, Nov 1999.

\_\_\_\_\_. Maternal, gestational and neonatal characteristics and maternal angiogenic factors in normotensive pregnancies. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 143, n. 1, p. 29-33, Mar 2009.

SZARKA, A. *et al.* Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. **BMC Immunol**, v. 11, p. 59, 2010.

TEN DIJKE, P.; ARTHUR, H. M. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 11, p. 857-69, Nov 2007.

TERRONE, D. A. *et al.* Leukocytosis is proportional to HELLP syndrome severity: evidence for an inflammatory form of preeclampsia. **South Med J**, v. 93, n. 8, p. 768-71, Aug 2000.

TJWA, M. *et al.* VEGF and PIGF: two pleiotropic growth factors with distinct roles in development and homeostasis. **Cell Tissue Res**, v. 314, n. 1, p. 5-14, Oct 2003.

TORSNEY, E. *et al.* Mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia has a generalized vascular abnormality. **Circulation**, v. 107, n. 12, p. 1653-7, Apr 2003.

TRACEY, K. J.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor: an updated review of its biology. **Crit Care Med**, v. 21, n. 10 Suppl, p. S415-22, Oct 1993.

TROGSTAD, L.; MAGNUS, P.; STOLTENBERG, C. Pre-eclampsia: Risk factors and causal models. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 25, n. 3, p. 329-42, Jun 2011.

TROISI, R.; POTISCHMAN, N.; HOOVER, R. N. Exploring the underlying hormonal mechanisms of prenatal risk factors for breast cancer: a review and commentary. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 16, n. 9, p. 1700-12, Sep 2007.

VAGO, J. P. *et al.* Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. **J Leukoc Biol**, v. 92, n. 2, p. 249-58, Aug 2012.

VANDENABEELE, P. *et al.* Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. **Trends Cell Biol**, v. 5, n. 10, p. 392-9, Oct 1995.

VAN ZEE, K. J. *et al.* Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 11, p. 4845-9, Jun 1992.

VELASCO-LOYDEN, G.; ARRIBAS, J.; LÓPEZ-CASILLAS, F. The shedding of betaglycan is regulated by pervanadate and mediated by membrane type matrix metalloprotease-1. **J Biol Chem**, v. 279, n. 9, p. 7721-33, Feb 2004.

VELZING-AARTS, F. V. *et al.* High serum interleukin-8 levels in afro-caribbean women with pre-eclampsia. Relations with tumor necrosis factor-alpha, duffy negative phenotype and von Willebrand factor. **Am J Reprod Immunol**, v. 48, n. 5, p. 319-22, Nov 2002.

VENKATESHA, S. *et al.* Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. **Nat Med**, v. 12, n. 6, p. 642-9, Jun 2006.

VINCE, G. S. *et al.* Interleukin-6, tumour necrosis factor and soluble tumour necrosis factor receptors in women with pre-eclampsia. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 102, n. 1, p. 20-5, Jan 1995.

VISSER, W. *et al.* Soluble tumor necrosis factor receptor II and soluble cell adhesion molecule 1 as markers of tumor necrosis factor-alpha release in preeclampsia. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 81, n. 8, p. 713-9, Aug 2002.

WALKER, J. J. Pre-eclampsia. **Lancet**, v. 356, n. 9237, p. 1260-5, Oct 2000.

WALLACE, K. *et al.* Seeking the mechanism(s) of action for corticosteroids in HELLP syndrome: SMASH study. **Am J Obstet Gynecol**, v. 208, n. 5, p. 380.e1-8, May 2013.

WALSH, S. W. *et al.* Placental isoprostane is significantly increased in preeclampsia. **FASEB J**, v. 14, n. 10, p. 1289-96, Jul 2000.

WANG, P.; BA, Z. F.; CHAUDRY, I. H. Administration of tumor necrosis factor-alpha in vivo depresses endothelium-dependent relaxation. **Am J Physiol**, v. 266, n. 6 Pt 2, p. H2535-41, Jun 1994.

WILLIAMS, M. A. *et al.* Plasma tumor necrosis factor-alpha soluble receptor p55 (sTNFp55) concentrations in eclamptic, preeclamptic and normotensive pregnant Zimbabwean women. **J Reprod Immunol**, v. 40, n. 2, p. 159-73, Nov 1998.

WINTROBE, M. M. **Clinical hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger 1981.

XIAO, J. P. *et al.* The increased maternal serum levels of IL-6 are associated with the severity and onset of preeclampsia. **Cytokine**, v. 60, n. 3, p. 856-60, Dec 2012.

YELAVARTHI, K. K.; HUNT, J. S. Analysis of p60 and p80 tumor necrosis factor-alpha receptor messenger RNA and protein in human placentas. **Am J Pathol**, v. 143, n. 4, p. 1131-41, Oct 1993.

YOUNG, B. C.; LEVINE, R. J.; KARUMANCHI, S. A. Pathogenesis of preeclampsia. **Annu Rev Pathol**, v. 5, p. 173-92, 2010.

ZHANG, L. J.; HAN, Y. H.; HAN, Y. Z. [Serum soluble Endoglin, plasma endothelin-1 and coagulation function in early onset severe preeclampsia with organ dysfunction]. **Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue**, v. 22, n. 6, p. 371-4, Jun 2010.

ZHAO, J. X.; ZENG, Y. Y.; LIU, Y. Fetal alloantigen is responsible for the expansion of the CD4(+)CD25(+) regulatory T cell pool during pregnancy. **J Reprod Immunol**, v. 75, n. 2, p. 71-81, Oct 2007.

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0618.0.203.000-10

**Interessado(a): Profa. Luci Maria Sant'Ana Dusse**  
**Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas**  
**Faculdade de Farmácia - UFMG**

### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 26 de abril de 2011, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Pré-eclâmpsia: inter-relação dos sistemas hemostático e inflamatório**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Maria Teresa Marques Amaral**  
**Coordenadora do COEP-UFMG**

## ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte



**Registro CEP: 035/2009** (Este número deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Belo Horizonte, 27 de abril de 2009.


Interessada: Valeria Cristina Sandrim

### Parecer:

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, em reunião do dia 24 de abril de 2009 analisou e **APROVOU** o protocolo de pesquisa “**Estudo haplotípico de novos variantes da eNOS em gestantes brancas e negras com pré-eclâmpsia: impacto sobre resposta terapêutica anti-hipertensiva.**”, registrado neste CEP sob número 035/2009, no qual V. Sa. figura como pesquisadora responsável.

### OBS.:

Após o início da pesquisa, o pesquisador responsável deverá enviar ao CEP relatórios semestrais e final (para o primeiro semestre o prazo é de 30 de junho; para o segundo semestre é 31 de dezembro).

  
Dr. Francisco das Chagas Lima e Silva  
Coordenador do CEP



## ANEXO C – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG)



0101171517112	21710	2017016
RUBRICA:	DATA:	
Inquívoco	21/06/2010	
ÓRGÃO / ENTIDADE:		
FHEMIG - Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais		

**FUNDAÇÃO HOSPITALAR DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

### **Solicitação de Emenda**

O CEP-FHEMIG recebeu, em 23 de Junho de 2010, solicitações de emenda ao Projeto: **“Pré-eclâmpsia e polimorfismos nos genes do fator VII e do receptor de estrogênio”**, enviados pela Pesquisadora Karina Braga Gomes Borges.

#### **EMENDAS SOLICITADAS:**

- Metodologia: inclusão de exames para a identificação de novos marcadores biológicos, importantes no diagnóstico e prognóstico da pré-eclâmpsia.
- Impacto ao sujeito da pesquisa: obtenção de coleta de 10 mL de sangue além do já utilizado.
- Alterações nos TCLE: (1) Para os grupos de gestantes com pré-eclâmpsia, (2) Para os grupos de gestantes controles, (3) Para o grupo de mulheres não gestantes.

#### **CONSIDERAÇÕES:**

- O projeto já foi apresentado e aprovado neste CEP em 2008.
- As alterações metodológicas são pertinentes e ampliam a qualidade do trabalho.
- O impacto aos participantes da pesquisa é mínimo e está devidamente previsto no TCLE.
- Os pesquisadores garantem o cumprimento da Resolução 196/96 do CNS/MS.

#### **PARECER:**

- **A FAVOR DA EMENDA SOLICITADA.**
- Os pesquisadores deverão citar quando solicitados o parecer de aprovação do CEP-FHEMIG 077/2008.

Belo Horizonte, 24 de Junho de 2010

*Vanderson Assis Romualdo*  
Vanderson Assis Romualdo  
Coordenador

**Vanderson Assis Romualdo**  
**COORDENADOR DO CEP-FHEMIG**

Alameda Vereador Álvaro Celso, 100 - Santa Efigênia - Belo Horizonte/MG  
CEP: 30150-260 - Fone: 0(xx)31 3239-9500 - Fax: 0(xx)31 3239-9579  
Site: <http://www.fhemig.mg.gov.br/> E-mail: [fhemig@fhemig.mg.gov.br](mailto:fhemig@fhemig.mg.gov.br)

**ANEXO D – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Municipal  
Odilon Behrens**



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

**Avaliação de Projeto de Pesquisa**

FR: 418196

**Número do Parecer:** 0681.0.000.216-11

**Título do Projeto:** "Pré-Eclâmpsia: inter-relação dos sistemas hemostático e inflamatório"

**Pesquisador Responsável:** Melina de Barros Pinheiro

**PARECER DO CEP/ HOB:** o projeto em apreço foi avaliado pelo CEP-HOB e aprovado.

Data da reunião: 12 de maio de 2011

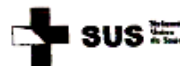
Atenciosamente,

  
**Ricardo Melo Marinho**  
Coordenador do CEP/HOB

## ANEXO E – Declaração da Gerência da Unidade Básica de Saúde da Família (UBSF) Guanabara / Betim



Prefeitura Municipal de Betim  
Secretaria Municipal de Saúde  
Hospital Público Regional de Betim - HPRB  
Maternidade do HPRB



### Declaração

Declaro, para os devidos fins, que estou de acordo com o desenvolvimento do projeto intitulado "PRÉ-ECLÂMPSIA: INTER-RELAÇÃO DOS SISTEMAS HEMOSTÁTICO E INFLAMATÓRIO" da Faculdade de Farmácia da UFMG, no posto de saúde UBSF Guanabara Betim.

Betim, 31 de agosto de 2010.

  
~~Wilson Ribeiro de Mello~~  
Enfermeiro  
Wilson Ribeiro de Mello  
Gerente UBSF Guanabara

## ANEXO F – Declaração da Diretoria do Hospital Público Regional de Betim



Prefeitura Municipal de Betim  
Secretaria Municipal de Saúde  
Hospital Público Regional de Betim - HPRB  
Maternidade do HPRB

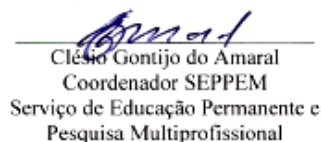


### Declaração

Declaramos, para os devidos fins, que estamos de acordo com o desenvolvimento do projeto intitulado "PRÉ-ECLÂMPسيا: INTER-RELAÇÃO DOS SISTEMAS HEMOSTÁTICO E INFLAMATÓRIO" da Faculdade de Farmácia da UFMG, na Maternidade do Hospital Público Regional de Betim, desde que seja aprovado por um comitê de ética em pesquisa.

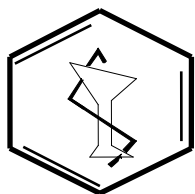
Betim, 09 de novembro de 2010.

  
Denise da Silva Kattah  
Gerente Maternidade

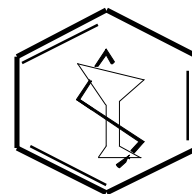
  
Clésio Gontijo do Amaral  
Coordenador SEPPEM  
Serviço de Educação Permanente e  
Pesquisa Multiprofissional

  
Geraldo Marcio Viana Zanon  
Diretor HPRB

**ANEXO G – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os grupos I, II e III**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS**



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Para o grupo de mulheres não gestantes)  
PROJETO DE PESQUISA: **“PRÉ-ECLÂMPسيا: INTER-RELAÇÃO DOS SISTEMAS HEMOSTÁTICO E INFLAMATÓRIO”**

Prezada Sra,

Você está sendo convidada para participar de uma pesquisa que tem por objetivo investigar as alterações da coagulação que ocorrem na pré-eclâmpsia e, dessa forma, contribuir para o maior entendimento desta doença. Você será incluída no grupo-controle, ou seja, de mulheres não gestantes.

Para realizar este estudo, gostaríamos de colher 15 mL do seu sangue para realização dos exames e armazenamento em um banco de amostras biológicas para estudos genéticos futuros.

Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar o risco de formação de hematomas, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente. Serão utilizados agulhas e tubos descartáveis.

Seu nome e os resultados dos exames serão mantidos em segredo.

Esclarecemos que caso não queira participar deste estudo, não haverá nenhum problema.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão abaixo relacionados.

Se você estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

Responsáveis:

Luci Maria Sant'Ana Dusse – telefone: 3409-6880

Lirlândia Pires de Sousa – telefone: 3409-6883

Melina de Barros Pinheiro – telefone: 3409-6880

Luiza Oliveira Perucci – telefone: 3313-6343

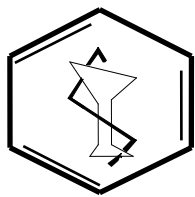
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/HOB: Rua Formiga, 50 - CEP: 31110-430 - Bairro São Cristovão. Telefone: (31) 3277-6198

NOME: \_\_\_\_\_

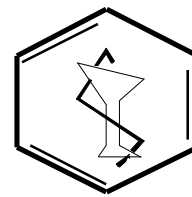
Carteira de identidade: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Agradecemos sua valiosa participação!



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS**



## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Para o grupo de gestantes controle)

### **PROJETO DE PESQUISA: “PRÉ-ECLÂMPسيا: INTER-RELAÇÃO DOS SISTEMAS HEMOSTÁTICO E INFLAMATÓRIO”**

Prezada Sra,

Você está sendo convidada para participar de uma pesquisa que tem por objetivo investigar as alterações da coagulação que ocorrem na pré-eclâmpsia e, dessa forma, contribuir para o maior entendimento desta doença. Você será incluída no grupo de gestantes controle, ou seja, que não apresentam a doença.

Para realizar este estudo, gostaríamos de colher 15 mL do seu sangue para realização dos exames e armazenamento em um banco de amostras biológicas para estudos genéticos futuros.

Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar o risco de formação de hematomas, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente. Serão utilizados agulhas e tubos descartáveis.

Seu nome e os resultados dos exames serão mantidos em segredo.

Esclarecemos que caso não queira participar deste estudo, não haverá nenhum comprometimento ao seu atendimento e tratamento.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão abaixo relacionados.

Se você estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

Responsáveis:

Luci Maria Sant’Ana Dusse – telefone: 3409-6880

Lirlândia Pires de Sousa – telefone: 3409-6883

Melina de Barros Pinheiro – telefone: 3409-6880

Luiza Oliveira Perucci – telefone: 3313-6343

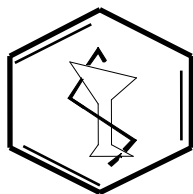
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/HOB: Rua Formiga, 50 - CEP: 31110-430 - Bairro São Cristovão. Telefone: (31) 3277-6198

NOME: \_\_\_\_\_

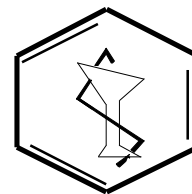
Carteira de identidade: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Agradecemos sua valiosa participação!



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Para o grupo de gestantes com pré-eclâmpsia)  
PROJETO DE PESQUISA: “**PRÉ-ECLÂMPسيا: INTER-RELAÇÃO DOS SISTEMAS HEMOSTÁTICO E INFLAMATÓRIO**”

Prezada Sra,

Você está sendo convidada para participar de uma pesquisa que tem por objetivo investigar as alterações da coagulação que ocorrem na pré-eclâmpsia e, dessa forma, contribuir para o maior entendimento desta doença.

Para realizar este estudo, gostaríamos de colher 15 mL do seu sangue para realização dos exames e armazenamento em um banco de amostras biológicas para estudos genéticos futuros.

Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar o risco de formação de hematomas, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente. Serão utilizados agulhas e tubos descartáveis.

Seu nome e os resultados dos exames serão mantidos em segredo.

Esclarecemos que caso não queira participar deste estudo, não haverá nenhum comprometimento ao seu atendimento e tratamento.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão abaixo relacionados.

Se você estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

Responsáveis:

Luci Maria Sant’Ana Dusse – telefone: 3409-6880

Lirlândia Pires de Sousa – telefone: 3409-6883

Melina de Barros Pinheiro – telefone: 3409-6880

Luiza Oliveira Perucci – telefone: 3313-6343

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/HOB: Rua Formiga, 50 - CEP: 31110-430 - Bairro São Cristovão. Telefone: (31) 3277-6198

NOME: \_\_\_\_\_

Carteira de identidade: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Agradecemos sua valiosa participação!

## ANEXO H – Fichas clínicas dos grupos I, II e III

FICHA CLÍNICA			
Projeto: "PRÉ-ECLÂPSIA: INTER-RELAÇÃO DOS SISTEMAS HEMOSTÁTICO E INFLAMATÓRIO"			
Data:			
Grupo: 1 - Mulheres não gestantes		Paciente nº:	
<b>1. Identificação</b>			
Nome:			
Nacionalidade:		Naturalidade:	
Data de nascimento:		Idade:	
Estado civil:		Escolaridade:	
Endereço:			
Rua/Avenida:			
Número:		Complemento:	
Bairro:		Cidade:	
CEP:		Estado:	
Telefone: ( )			
<b>2. Anamnese</b>			
Presença de doenças intercorrentes? (distúrbios da coagulação, doenças cardiovasculares, doenças renais, doenças autoimunes, doenças hepáticas, diabetes, câncer, sangramento, história familiar)			
Fumante? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Consumo de álcool? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO		Quantidade:	
Prática exercício físico? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Frequência:		Modalidade:	
Uso de medicamentos? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
SE SIM. Quais medicamentos?			
Gestações? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Se SIM. Quantas?			
Intercorrências durante a gestação? (hipertensão, pré-eclâpsia, aborto, parto prematuro)			
<b>3. Exame físico</b>			
Altura: _____ cm			
Peso: _____ Kg			
IMC:			
Pressão arterial: _____ / _____ mmHg			



FICHA CLÍNICA			
Projeto: "PRÉ-ECLÂMPسيا: INTER-RELAÇÃO DOS SISTEMAS HEMOSTÁTICO E INFLAMATÓRIO"			
<b>Data:</b>			
<b>Grupo 2: Gestantes normotensas</b>		<b>Paciente nº:</b>	
<b>1. Identificação</b>			
Nome:			
Prontuário número:			
Nacionalidade:		Naturalidade:	
Data de nascimento:		Idade:	
Estado civil:		Escolaridade:	
Endereço:			
Rua/Avenida:			
Número:		Complemento:	
Bairro:		Cidade:	
CEP:		Estado:	
Telefone: ( )			
<b>2. Anamnese</b>			
Presença de doenças intercorrentes? (distúrbios da coagulação, doenças cardiovasculares, doenças renais, doenças autoimunes, doenças hepáticas, diabetes, câncer, sangramento, pré-eclâmpsia na família, complicações em gravidez anterior)			
Fumante? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Consumo de álcool? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO		Quantidade:	
Prática exercício físico? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Frequência:		Modalidade:	
<b>3. Informações sobre a(s) gestação(ões)</b>			
Idade gestacional: _____ semanas			
Pré-natal? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Gravidez múltipla? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
GPA (Gravidez Parto Aborto): ____ / ____ / ____			
Mesmo pai?			
Partos vaginal (PN) ou cirúrgico (PC)?			
Intervalo interpartal (meses):			
Parto prematuro?			
Filhos vivos:			
<b>4. Uso de medicamentos?</b> <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
SE SIM. Quais medicamentos?			
<b>5. Informações clínicas</b>			
Altura: _____ cm			
Peso: _____ Kg			
Ganho de peso na gravidez:			
Pressão arterial: _____ / _____ mmHg			

FICHA CLÍNICA			
Projeto: "PRÉ-ECLÂMPSIA: INTER-RELAÇÃO DOS SISTEMAS HEMOSTÁTICO E INFLAMATÓRIO"			
Data:			
Grupo 3: Gestantes com pré-eclâmpsia		Paciente nº:	
Diagnóstico de pré-eclâmpsia dado em: ____/____/____			
Médico responsável:			
<b>1. Identificação</b>			
Nome:			
Prontuário número:			
Nacionalidade:		Naturalidade:	
Data de nascimento:		Idade:	
Estado civil:		Escolaridade:	
Endereço:			
Rua/Avenida:			
Número:		Complemento:	
Bairro:		Cidade:	
CEP:		Estado:	
Telefone: ( )			
<b>2. Anamnese</b>			
Presença de doenças intercorrentes? (distúrbios da coagulação, doenças cardiovasculares, doenças renais, doenças autoimunes, doenças hepáticas, diabetes, câncer, sangramento, pré-eclâmpsia na família, complicações em gravidez anterior)			
Fumante? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Consumo de álcool? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO		Quantidade:	
Prática exercício físico? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Frequência:		Modalidade:	
<b>3. Informações sobre a(s) gestação(ões)</b>			
Idade gestacional: ____ semanas			
Pré-natal? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Gravidez múltipla? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
GPA (Gravidez Parto Aborto): ____/____/____			
Mesmo pai?			
Partos vaginal (PN) ou cirúrgico (PC)?			
Intervalo interpartal (meses):			
Parto prematuro?			
Filhos vivos:			
Principais queixas:			
<input type="checkbox"/> Cefaléia <input type="checkbox"/> Epigastralgia <input type="checkbox"/> Escotoma <input type="checkbox"/> Reflexo patelar			
<input type="checkbox"/> Outros			
<b>4. Uso de medicamentos</b>			
<input type="checkbox"/> Nifedipina <input type="checkbox"/> Metildopa <input type="checkbox"/> Sulfato de magnésio			
<input type="checkbox"/> Outros			
<b>5. Informações clínicas e laboratoriais</b>			
Altura: ____ cm			
Peso: ____ Kg			
Ganho de peso na gravidez: ____ Kg			
Exames laboratoriais:			
Data da realização:			



## **ANEXO I – Apresentação do trabalho em eventos científicos**

**PERUCCI, L. O.** ; FREITAS, L. G. ; GODOI, L. C. ; ALPOIM, P. N. ; PINHEIRO, M. B. ; BORGES, K. B. G. ; DUSSE, L. M. S. ; SOUSA, L. P. Circulating levels of soluble endoglin (CD105) in mild and severe preeclampsia. In: V Simpósio Latino Americano sobre Interação Materno-Fetal e Placenta, 2013, Foz do Iguaçu. Sociedade Latino Americana de Interação Materno-Fetal e Placenta, 2013.

**PERUCCI, L. O.** ; FREITAS, L. G. ; GODOI, L. C. ; ALPOIM, P. N. ; PINHEIRO, M. B. ; BORGES, K. B. G. ; DUSSE, L. M. S. ; SOUSA, L. P. Circulating levels of soluble endoglin (CD 105) in maternal plasma in preeclampsia. In: 5th International Symposium on Women's Health Issues in Thrombosis and Haemostasis, 2013, Vienna, Austria. Women's Health Issues in Thrombosis and Haemostasis, 2013.

**PERUCCI, L. O.** ; FREITAS, L. G. ; GODOI, L. C. ; ALPOIM, P. N. ; PINHEIRO, M. B. ; BORGES, K. B. G. ; DUSSE, L. M. S. ; SOUSA, L. P. Circulating levels of soluble endoglin (CD105) in mild and severe preeclampsia. In: VI Encontro de Pesquisa em Bioquímica e Imunologia, 2012, Belo Horizonte. Instituto de Ciências Biológicas - UFMG, 2012.